

Том 60, Номер 4

ISSN 0044-4529
Июль - Август 2024



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

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



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 4, 2024

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Роль апоптоз-ассоциированных белков P53 и BCL-2
в патогенезе заболеваний нервной системы

Е. Д. Бажанова, А. А. Козлов

331

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Уровень триптофановых сигнальных молекул
у детей с различной динамикой развития ожирения

*О. П. Шатова, И. М. Колесникова, Е. М. Ягодкина,
С. С. Кайдошко, А. М. Гапонов, С. А. Румянцев, А. В. Шестопалов*

346

Сравнительная скелетотопия поясничного отдела спинного мозга млекопитающих

П. Ю. Шкорбатова, В. А. Ляховецкий, А. А. Вещицкий, Н. С. Меркулева

358

Влияние фенантрена на электрическую активность
желудочковых кардиомиоцитов трески (*Gadus morhua*)

Т. С. Филатова, А. В. Шамишура, Д. В. Абрамочкин

372

Иммунофлуоресцентное выявление и определение локализации
Ca²⁺-сенсорных белков в двигательной мускулатуре
дождевого червя *Lumbricus terrestris*

Л. Ф. Нуруллин, Н. Д. Алмазов, Е. М. Волков

383

Влияние апамина на профили внеклеточно регистрируемых потенциалов
действия кардиомиоцитов субэпикарда в модели инфаркта миокарда у крыс

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

392

Концентрация и состав циркулирующих адипоцитарных везикул
у больных с полипами толстой кишки и колоректальным раком

*Н. В. Юнусова, Д. А. Сваровский, Е. С. Колегова, О. В. Черемисина,
Д. Н. Костромицкий, И. В. Кондакова, Е. А. Сиденко, А. Ю. Добродеев, А. Е. Григорьева*

403

Иммунизация самцов мышей BALB/c и C57BL/6 изменяет состав
их мочи и реакцию самок на ее запах

*А. С. Хоцкина, Ю. В. Патрушев, Д. И. Юсупова, Л. А. Герлинская,
Д. В. Петровский, М. П. Мошкин, Е. Л. Завьялов*

411

Развитие колонии каирской иглистой мыши
(*Acomys sahirinus*) в лабораторных условиях

*П. Ю. Шкорбатова, А. А. Вещицкий, А. А. Михалкин, Н. И. Никитина,
А. В. Беляев, Н. С. Меркулева*

421

Contents

Vol. 60, No. 4, 2024

REVIEWS

Role of Apoptosis-Associated Proteins P53 and BCL-2
in the Pathogenesis of Nervous System Diseases

E. D. Bazhanova and A. A. Kozlov

331

EXPERIMENTAL ARTICLES

Level of Tryptophan Signaling Molecules in Children
with Different Dynamics of Obesity Development

*O. P. Shatova, I.M. Kolesnikova, E. M. Yagodkina, S. S. Kaydoshko,
A. M. Gaponov, S.A. Roumiantsev and A. V. Shestopalov*

346

Comparative Skeletopy of the Mammalians Lumbar Spinal Cord

P. Yu. Shkorbatova, V. A. Lyakhovetskii, A. A. Veshchitskii and N. S. Merkulyeva

358

The Effects of Phenanthrene on Electrical Activity
in Ventricular Cardiomyocytes of Atlantic Cod (*Gadus morhua*)

T. S. Filatova, A. V. Shamshura and D. V. Abramochkin

372

Immunofluorescent Localization of Ca²⁺-Sensor Proteins
in The Somatic Motor Muscles of The Earthworm *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin, N. D. Almazov and E. M. Volkov

383

Influence of Apamin on the Extracellularly Recorded Action Potentials Profiles
of Subepicardial Cardiomyocytes of the Rat Heart in Myocardial Infarction

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

392

Concentration and Composition of Circulating Vesicles of Adipocytic Origin
in Patients with Colon Polyps and Colorectal Cancer

*N. V. Yunusova, D. A. Svarovsky, E. S. Kolegova, O. V. Cheremisina, D. N. Kostromitsky,
I. V. Kondakova, E. A. Sidenko, A. Yu. Dobrodeev and A. E. Grigor'eva*

403

Immunization of Male BALB/c and C57BL/6 Mice Similar Modulates
Chemical Signals Detected in Both Chromatographic and Behavioral Tests

*A. S. Khotskina, Y. V. Patrushev, D. I. Yusupova, L. A. Gerlinskaya,
D. V. Petrovskii, M. P. Moshkin and E. L. Zavjalov*

411

Development of *Acomys cahirinus* in the Laboratory Conditions

*P. Y. Shkorbatova, A. A. Veshchitskii, A. A. Mikhalkin,
N. I. Nikitina, A. V. Belyaev and N.S. Merkulyeva*

421

РОЛЬ АПОПТОЗ-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ p53 И Bcl-2 В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2024 г. Е. Д. Бажанова^{1,2,*}, А. А. Козлов²

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

²Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: bazhanovae@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 04.07.2024 г.

Принята к публикации 30.07.2024 г.

Заболевания центральной нервной системы занимают ведущее место, наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими, и доля пациентов, страдающих болезнями нервной системы, увеличивается по мере старения населения. В эту группу входят острые состояния, такие, как ишемический инсульт, и хронические многофакторные заболевания — болезни Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсия и др. Разработка специфических методов их лечения затруднена, а эффективность имеющихся препаратов невысока. В основе практически всех заболеваний головного мозга лежат общие механизмы, такие как окислительные стресс, воспаление и гибель нейронов. Чаще всего клетки гибнут путём апоптоза из-за нарушения баланса между проапоптотическими и антиапоптотическими факторами. В данной работе рассмотрены два из них: способствующий апоптозу фактор транскрипции и супрессор опухолей p53 и противостоящий ему белок В-клеточной лимфомы Bcl-2. Выбор данных белков для исследования обусловлен тем, что оба белка являются ключевыми регуляторами апоптоза и имеют важное значение в патогенезе нервных заболеваний, поскольку зрелые нейроны не являются пролиферирующими клетками. Белок p53 участвует в регуляции множества генов, ответственных за репарацию ДНК, апоптоз, другие биохимические клеточные процессы, особенно важно это при исследовании патологии нейронов. Bcl-2 подавляет апоптоз в различных клетках, в том числе нейронах, контролируя проницаемость мембран митохондрий и ингибируя каспазы. При заболеваниях его экспрессия может как повышаться, например, в случае злокачественных опухолей, так и снижаться, как в случае с нейродегенеративными процессами. Установлено, что p53 и Bcl-2 находятся в тесном взаимодействии в процессе регуляции апоптоза, их соотношение может являться важным прогностическим фактором. Целью данной работы была оценка роли этих белков в патогенезе различных заболеваний нервной системы, и поиск общих закономерностей изменений их экспрессии и коэкспрессии.

Ключевые слова: апоптоз, p53, Bcl-2, патогенез, заболевания нервной системы, эпилепсия

DOI: 10.31857/S0044452924040019, **EDN:** YQIJBC

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным, опубликованным в 2012 г., ежегодные затраты на обследование и лечение заболеваний головного мозга превышают стоимость всех других заболеваний вместе взятых, включая сердечно-сосудистые болезни, злокачественные новообразования и диабет. Эти затраты будут расти по мере старения населения, поскольку именно возраст является основным фактором риска нейродегенеративных заболеваний. Более молодые категории населения поражают другие заболевания нервной системы, среди которых расстройства аутистического спектра (РАС), шизофрения и умственная отсталость. Крайние возрастные катего-

рии уязвимы для эпилепсии, для депрессии возраст значения почти не имеет.

Всемирная организация здравоохранения пришла к выводу, что на заболевания головного мозга приходится примерно треть общего бремени болезней в Европе. Разработка лекарств против них затруднена, а имеющиеся препараты чаще всего могут лишь отсрочить начало заболевания или облегчить симптомы. Одной из основных проблем здесь является отсутствие идентифицированных мишеней для лекарств, поскольку молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе ряда заболеваний нервной системы, изучены не до конца. Чтобы изменить это, необходимы большие усилия по изучению этиологии и патогенетических ме-

ханизмов нарушений как развивающегося, так и взрослого мозга [1].

Дегенеративные процессы и гибель нейронов являются важными признаками различной патологии ЦНС: от нейродегенеративных заболеваний и эпилепсии, до последствий травм. Выделяют более 12 типов клеточной гибели, среди которых внутренний и внешний апоптоз, онкоз, некроптоз, партаноз, ферроптоз, сармоптоз, аутофагия, аутоз, автолиз, параптоз, пироптоз, фагоптоз и переход митохондриальной проницаемости. Несмотря на десятилетия исследований и тысячи статей, роль каждого из них до конца еще не раскрыта [2].

В патогенезе многих заболеваний нервной системы, среди которых эпилепсия, особенно фармако-резистентная, наибольшее значение имеет апоптоз нейронов и глиальных клеток головного мозга, роль которого и будет рассмотрена [3].

Целью данной работы была оценка роли апоптоз-ассоциированных белков p53 и Bcl-2 в патогенезе различных заболеваний нервной системы, острых и хронических, и поиск общих закономерностей изменений их экспрессии и коэкспрессии в нервной системе при патологии. Несмотря на значительное количество работ, посвященных изменению уровня данных белков при различных неврологических проблемах, в настоящее время нет работ, обобщающих уже полученные данные. В связи с этим мы представляем анализ современных исследований, как экспериментальных, так и клинических, представляющих данные о механизмах апоптоза при различных заболеваниях нервной системы, и особое внимание уделено роли проапоптотического белка p53 и антиапоптотического Bcl-2.

Апоптоз в патогенезе заболеваний нервной системы

Рассмотрим примеры некоторых заболеваний и роль апоптоза в их патогенезе.

Ишемический инсульт, вызванный артериальной окклюзией, является распространенным типом инсульта, который входит в число наиболее частых причин инвалидности и смертности во всем мире. Для уменьшения его последствий необходимо быстрое нейропротекторное вмешательство, но точные механизмы гибели нейронов остаются неизученными, что ограничивает разработку лекарств. Основной проблемой терапии инсульта является поиск эффективного нейропротектора [4]. В патогенезе ишемического инсульта участвуют несколько путей клеточной гибели, включая апоптоз, опосредуемый внутренним и внешнерецепторным путями, некроптоз, аутофагию, ферроптоз, партаноз, фагоптоз и пироптоз. При возникновении инсульта нарушается транспорт кислорода, глюкозы и других субстратов. Нейроны при этом переходят от аэробного окисления к анаэробному, а потребление

АТФ быстро превышает его синтез. Падение его концентрации в нейронах снижает ионные градиенты, а также ухудшает приток $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ и отток K^+ . Нарушение работы ионных каналов вызывает деполяризацию нейронов и высвобождает огромное количество возбуждающих нейротрансмиттеров, таких как глутамат. Впоследствии Ca^{2+} запускает внутренний путь апоптоза, а также некоторые другие цитоплазматические и ядерные события, ведущие нейрон к гибели. Перегрузка Ca^{2+} запускает активацию кальпаина, а одним из основных субстратов кальпаина является антиапоптотический белок Bcl-2. Во время ишемии в нейронах также имеет место повреждение ДНК, ответом на которое становится активация p53. При восстановлении кровотока после ишемии образуется большое количество активных форм кислорода (АФК), что также запускает апоптоз. Нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера и сигнальные молекулы, такие как цитокины, высвобождаемые астроцитами, микроглией и олигодендроцитами, запускают воспалительные каскады, продолжающие работу дни и недели после ишемии. Активация иммунных клеток во время воспаления может инициировать внешний путь апоптоза через TNF- α/β , лиганд Fas (FasL) и рецептор-лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF (TRAIL-R) [5,6].

Несмотря на значительный прогресс в изучении шизофрении, этиология и патофизиология этого сложного заболевания остаются неясными. Большинство причин имеют наследственный характер, но нельзя отрицать и роль других факторов, таких как материнские инфекции, недоедание, употребление каннабиса и психосоциальный стресс. Есть предположение, что шизофрения может включать ограниченный нейродегенеративный процесс, который начинает проявляться с появлением клинических симптомов. В его основе может лежать апоптоз. Большинство посмертных и нейровизуализационных исследований больных шизофренией показало небольшие изменения в структуре мозга. Среди них уменьшение коры, снижение числа синапсов, плотности дендритных отростков и уменьшение длины дендритов без масштабной потери нейронов. Аналогичные изменения происходят в гиппокампе. Однако исследования также показывают региональное и послойное снижение плотности пирамидных и непирамидных нейронов в коре и гиппокампе. Эти изменения носят прогрессивный характер на разных стадиях шизофрении. Основная потеря серого вещества при этом происходит не за счёт гибели нейронов целиком, а локально — в синапсах, дендритах, аксонах. Апоптоз участвует в патогенезе шизофрении, но не является основным патогенетическим фактором [7]. Одним из факторов риска шизофрении признаны дефекты митохондрий, как наследственные, так и

приобретённые, но связанные с воспалительными и апоптотическими процессами в нейронах. Дисфункция митохондрий нарушает синаптическую передачу, метаболизм кальция и активность потенциалов действия, что приводит к аномальной работе нейронов [8].

Молекулярный патогенез расстройств аутистического спектра (РАС) до сих пор так же неясен, как и в случае с шизофренией. До сих пор полностью не раскрыты функциональные и молекулярные изменения в мозге пациентов с РАС. Тем не менее, РАС приводят к значительной смертности среди детей, проблемам с социализацией, общением и поведенческими нарушениями. В мозге больных обнаружены следующие изменения: чрезмерный рост аксонов и дендритов, гибель гранулярных клеток, снижение количества, атрофия клеток Пуркинье в мозжечке, абберрантная миелинизация. К таким изменениям может привести патологическая активация нейровоспалительных и апоптотических путей. Имеющиеся данные позволяют предположить, что клеточный стресс, окислительный стресс и апоптоз могут способствовать развитию аутистического фенотипа [9, 10]. С помощью методов транскриптомики выявлены абберрантные синаптические, метаболические, пролиферационные, иммунные механизмы, сигнальные каскады апоптоза, участвующие в патогенезе РАС. Такие изменения характерны и для наследственных заболеваний, предрасполагающих к аутизму, таких как синдром Ретта и ломкая X-хромосома. В наибольшей степени поражаются мозжечок и лобная кора. Исследования мозга больных показывают снижение уровней экспрессии антиапоптотических белков, либо увеличение экспрессии проапоптотических белков в лобной коре головного мозга и мозжечке при РАС [11].

Недавние исследования показали, что митохондриальная дисфункция, нарушение регуляции нейровоспалительных и апоптотических путей участвуют в патофизиологии большого депрессивного расстройства [12]. Секвенирование РНК из образцов периферической крови десяти подростков с большим депрессивным расстройством и десяти здоровых подростков из контрольной группы, выявило 18 930 дифференциально экспрессируемых генов, среди которых были гены, участвующие в апоптозе [13].

Апоптоз нейронов и глиальных клеток головного мозга имеет большое значение в патогенезе эпилепсии, особенно её лекарственно-устойчивых форм. С каждым припадком апоптоз вызывает нарастающие повреждения головного мозга, что особенно проявляется в гиппокампе, приводя, в том числе, к развитию лекарственной устойчивости и множеству когнитивных нарушений [14]. В патогенезе эпилепсии задействованы как внешнерецепторный путь апоптоза, активируемый связыванием

лигандов с малой молекулярной массой и рецепторов клеточной смерти семейства фактора некроза опухоли (TNF), таких как TNFR1, Fas (CD95), DR4 (TRAIL рецептор 1), DR5 (TRAIL рецептор 2), так и внутренний, митохондриальный, основанный на регуляции проницаемости внешней мембраны митохондрий с помощью белков семейства Bcl-2. При этом активация внешнего пути часто предшествует внутреннему. В этих каскадах задействованы каспазы-3 и -7. Повышение их уровня в эпилептических очагах после судорог не оставляет сомнений в вовлечённости апоптоза в эпилептогенез [15]. Показано, что после судорог возникают многочисленные структурные и функциональные аномалии митохондрий в нейронах, которые в дальнейшем также могут вызывать судороги [16]. Роль апоптоза показана при посттравматической эпилепсии, которая характеризуется развитием отсроченных неспровоцированных припадков после черепно-мозговой травмы и занимает до 20% в общей статистике заболеваемости. Несмотря на значительные усилия, предпринятые для понимания её патогенеза и повышения эффективности лечения, часто эта форма эпилепсии не поддаётся терапии имеющимися препаратами. Как и в случае эпилепсии другого генеза, во время судорог происходит апоптоз нейронов. Более того, повторные приступы повреждают нейроны и вызывают их гибель и вторичную потерю. Исследования выявили типичные признаки апоптоза в поврежденных отделах мозга, такие как повышенные уровни экспрессии каспазы-3 и Bax [17].

Нейродегенеративные расстройства характеризуются прогрессирующей потерей определенных популяций нейронов. Апоптоз участвует в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона, боковой амиотрофический склероз.

Болезнь Паркинсона — прогрессирующее неврологическое расстройство, характеризующееся дофаминергической нейродегенерацией в черной субстанции мозга. Семейные формы болезни Паркинсона связаны с мутациями в генах, в большинстве случаев она является идиопатической. Для болезни Паркинсона характерны патологические тельца Леви в нейронах, возникающие в результате агрегации α -синуклеина, который локализуется пресинаптически, особенно в нервных окончаниях. Кроме того, α -синуклеин локализуется в митохондриальной мембране, что приводит к окислительному стрессу и активации внутреннего пути апоптоза. Апоптоз рассматривается как механизм потери дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона, о чем свидетельствует идентификация апоптотических клеток и фрагментация ДНК, сверхэкспрессия активной каспазы-8, -9 и -3, повышенные уровни проапоптотических белков и

снижение уровней антиапоптотических белков в дофаминергических нейронах [18].

Болезнь Альцгеймера считается основной формой деменции у пожилых людей. Патологически она характеризуется накоплением β -амилоидных бляшек, нейрофибриллярных клубков и накоплением гиперфосфорилированного тау-белка. Как и в случае с болезнью Паркинсона, β -амилоид накапливается на внешней мембране митохондрий нейронов, запуская окислительный стресс и активируя внутренний каскад апоптоза. В мозге пациентов была обнаружена фрагментация ДНК с помощью метода TUNEL, сниженная экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2, сверхэкспрессия проапоптотического белка BAX и наличие активированной каспазы-3 в нейронах с нейрофибриллярными клубками [18].

Болезнь Гентингтона — это аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется прогрессирующим нарушением координации произвольных движений, а также поведенческими и когнитивными нарушениями. Она вызвана аномальным увеличением числа тринуклеотидных повторов CAG в гене, кодирующем белок гентингтин, следствием чего является дегенерация ГАМКергических нейронов неостриатума у пациентов. Мутантный гентингтин индуцирует апоптоз нейронов и является субстратом для каспазы-3, которая расщепляет его на более мелкие нейротоксичные пептиды, и нарушает равновесие между проапоптотическими и антиапоптотическими молекулами, может взаимодействовать с митохондриями, вызывая их дисфункцию. При болезни Гентингтона показана характерная для апоптоза фрагментация ДНК (TUNEL) [18].

Боковой амиотрофический склероз поражает мотонейроны коры и передних рогов спинного мозга, в результате наблюдается прогрессирующий паралич всех конечностей, дыхательной и глоточной мускулатуры, что приводит к смерти в течение 3–5 лет после начала заболевания. У 20 % пациентов выявлена мутация гена, кодирующего супероксиддисмутазу. Таким образом, патогенез заболевания включает перегрузку нейронов кальцием и окислительный стресс, приводящий к нарушению функции митохондрий и активации внутреннего пути апоптоза. Как и в случае других нейродегенеративных заболеваний, здесь выявлены фрагментация ДНК, активация каспазы-9, сверхэкспрессия BAX и снижение экспрессии Bcl-2 [18].

p53 и апоптоз нейронов

Фактор транскрипции и супрессор опухолей p53 — тетрамерный фосфопротеин, который управляет рядом основных клеточных функций, включая транскрипцию генов, синтез и репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, старение и ги-

бель клеток. Этот белок является одним из ключевых модуляторов реакции клеток на стресс, активация которого запускает апоптоз в различных типах клеток, в число которых входят и нейроны. P53 относится к обширному семейству генов, таких как p63 и p73. Все они имеют много общего: ключевые функциональные домены, включая N-концевой домен трансактивации, C-концевой домен олигомеризации и консервативный ДНК-связывающий домен. При сверхэкспрессии p63 и p73 могут брать на себя часть функций p53, активируя те же гены-мишени и индуцируя апоптоз. Однако их роль в апоптозе нейронов до конца не ясна. В отличие от p53, который не играет явной роли в нормальном развитии, p63 необходим для развития некоторых тканей, например, эпителия, а p73 функционирует преимущественно в центральной нервной системе (ЦНС), в укороченной форме p73b выполняя антиапоптотическую функцию. При обсуждении роли p53 в гибели клеток головного мозга важно различать апоптоз, возникающий в ответ на повреждение или травму, и гибель клеток, происходящую во время нейрогенеза и в норме во взрослом мозге [19].

P53 — эволюционно консервативный белок, ген которого появился около 600–800 миллионов лет назад у первых многоклеточных животных, и его пути опосредуют подавление опухолевого роста посредством информированного, регулируемого и интегрированного набора ответов на изменения окружающей среды, приводящие либо к гибели клеток, либо к поддержанию клеточного гомеостаза [20]. Белки p53 и MDM2 образуют центральный узел этого пути, который получает стрессовые сигналы через MDM2 и реагирует через p53, модулируя и изменяя множество других путей и функций в клетке. Концентратор MDM2-p53 является одним из хабов, на котором сходятся множество сигнальных путей, чем обусловлена его многофункциональность, выходящая за простой запуск апоптоза. Это узел обеспечивает адекватную реакцию клетки стресс различного генеза. По крайней мере, 14 различных сигналов стресса передают информацию MDM2 в узел пути MDM2-p53. Для этих путей характерна избыточность, повышающая надёжность. Он останавливает клеточный цикл как в фазе G1, так и G2, что являются прекрасным примером избыточности путей внутри концентратора MDM2-p53 [21]. Метаболические пути — это еще один большой набор сетей, с которыми активно работает p53. Он запускает транскрипцию TP53-индуцированного регулятора гликолиза и апоптоза (TIGAR), белка, который снижает гликолитическую активность и уровни АФК во время онкогенеза. p53 также индуцирует SCO2 (цитохромоксидаза 2), которая регулирует митохондриальное дыхание. Паркин, белок, кодируемый p53-регулируемым ге-

ном в митохондриях, опосредует митофагию после повреждения ДНК и останавливает активность АФК [22]. p53 индуцирует некоторые сестрины, которые дополнительно связывают его с регуляцией АФК и передачей сигналов mTOR. Гены, регулируемые p53, кодирующие PTEN, β -субъединицу 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK) и туберин (TSC2), регулируют мишень комплекса рапамицина 1 (mTORC1) и mTORC2 у млекопитающих, которые, в свою очередь, играют центральную роль в эффективной трансляции и регуляции роста и деления клеток. Таким образом, для p53 характерны обширные связи с клеточным циклом и метаболическими процессами, а также избыточность способов воздействия на них, что необходимо учитывать при рассмотрении роли этого белка при апоптозе в норме и патологии. Из-за многообразия функций его нельзя рассматривать в отрыве от других происходящих в клетке событий [23].

Экспрессия p53 повышена в повреждённых нейронах на моделях острых повреждений, таких как ишемия и эпилепсия, а также в образцах ткани головного мозга, полученных на животных моделях и у пациентов с хроническими нейродегенеративными заболеваниями. Однако не факт, что активация p53 приведёт нейроны к гибели, о чем свидетельствует мышинная модель синдрома Ангельмана,

где активность p53 оказывала сублетальное воздействие на нейроны, кульминацией которого не являлась их гибель [24]. Хронический окислительный стресс активировал p53 до уровня, при котором активность каспаз отмечалась лишь в аксонах и дендритах, способствуя их истончению и деградации синапсов [25]. Дефицит p53 или его ингибирование защищает нейроны от широкого спектра острых токсических воздействий, таких как фокальная ишемия [26], гипоксия, ионизирующее излучение [27], введение каиновой кислоты [28], повреждающих ДНК агентов, глутамата. Однако лишённые p53 нейроны мозжечка всё равно гибнут при переносе в среду с низким содержанием калия или воздействию растительного нейротоксина метилазоксиметанола, а постнатальные нейроны коры и гиппокампа не выдерживают действия антибиотика стауроспорина [29].

Концентрация p53 в нейронах быстро нарастает в ответ на повреждения, включая окислительный и метаболический стрессы, гипоксию, гипогликемию, нарушение трофики, избыток кальция в клетках и вирусные инфекции (рис. 1). Общим местом всех этих состояний, объединяющим различные пути передачи сигналов стресса, и инициирующим p53-опосредованный апоптоз, может служить окислительное повреждение ДНК. Окислительное

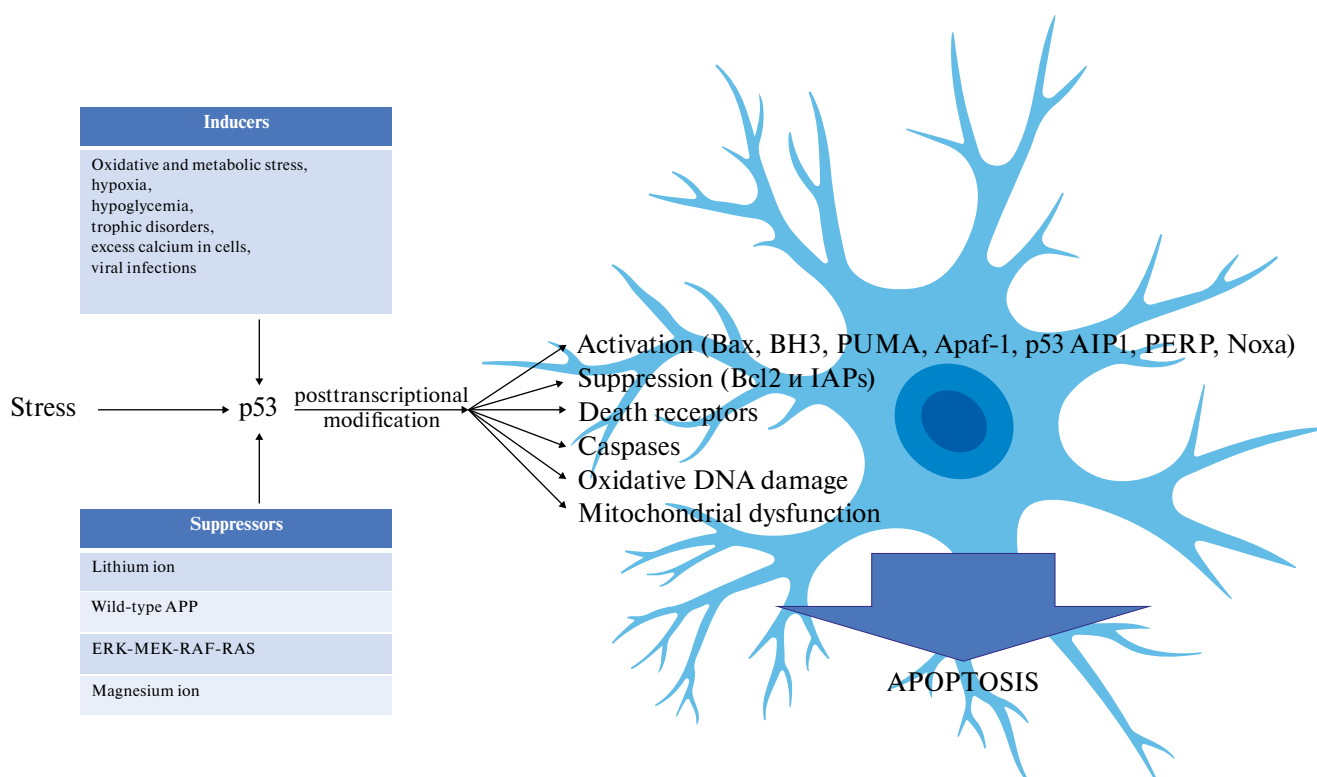


Рис. 1. Роль p53 в апоптозе нейронов.

повреждение ДНК специфично. При нём наблюдается модификация оснований гидроксильными радикалами (8-гидрокси-20-дезоксигуанозин), расщепление N-гликозидных связей дезоксинуклеотидов с образованием апуринов-апиримидиновых сайтов (AP-сайтов) и разрывы. Оно затрагивает и белки репарации, усиливая повреждения ДНК [30]. Иногда для активации p53 достаточно разрушения ядрышка, что и было предложено в качестве ключевого механизма для интеграции известных стимулов активации p53, но в нейронах подобного не выявлено. При активации p53 подвергается ряду посттрансляционных модификаций, повышающих его стабильность или аффинность связывания ДНК, в числе которых фосфорилирование N-концевых остатков, фосфорилирование по остаткам серина или треонина, ацетилирование остатков в C-концевой области, поли(ADP) рибозилирование, модификация убиквитиноподобным белком SUMO [31]. Модификации p53 могут различаться между популяциями нейронов, зависеть от тяжести повреждений и возраста. За этим следует активация генов, кодирующих проапоптотические белки Bax, Bcl-2, PUMA, Araf-1, p53 AIP1, PERP, Noxa, и транскрипционная репрессия генов выживания, таких как Bcl2 и IAPs (рис. 1). В дополнение к транскрипционной активации, вызывающей гибель клетки, p53 может прямо запускать апоптоз, действуя на уровне митохондрий. Как фактор транскрипции p53 изучен хорошо, но его роль в апоптозе нейронов не ограничивается этим. В p53-опосредованном апоптозе могут участвовать механизмы, независимые от транскрипционной активности p53. Они могут включать пролонгированную активацию механизмов репарации ДНК, транслокацию Fas-рецепторов на клеточную мембрану, активацию каспаз и транслокацию p53 в митохондрии. Кроме того, p53 может локально действовать в синапсах, опосредуя митохондриальную дисфункцию и синаптическую дегенерацию в ответ на повреждение ДНК, окислительные или эксайтотоксические воздействия. Это может иметь важное значение при различных нейродегенеративных заболеваниях, но точный механизм инициации p53-опосредованной митохондриальной дисфункции в синапсах еще предстоит раскрыть. Возможно, он связан с взаимодействием p53 и антиапоптотического белка семейства Bcl-2 Bcl-xL. Ведущая роль p53 в инициации нейронального апоптоза показана на примере действия его ингибиторов, предотвращающих гибель клеток, антисмысловых олигонуклеотидов или нокаута гена [32].

p53 в нервной системе функционирует как в физиологических условиях, при формировании и развитии ЦНС, так и при неврологических расстройствах, таких как инсульт, болезни Альцгеймера и Паркинсона, синдром Ангельмана, черепно-мозго-

вые травмы, боковой амиотрофический склероз, аутизм, спинocerebellарная атаксия и эпилепсия [33].

Апоптоз нейронов играет важную роль в патофизиологии ишемического повреждения головного мозга и его последствий. После инсульта p53 быстро накапливается в пострадавшей области мозга, где активирует апоптоз нейронов посредством как транскрипционно-зависимых, так и независимых программ. Он быстро перемещается в митохондрии и взаимодействует с проапоптотическими белками семейства Bcl-2, такими как Bcl-xL, которые активируют митохондриальный путь апоптоза, с более высокой эффективностью, чем если бы p53 выступал в своей обычной роли фактора транскрипции. Этот процесс занимает не более часа. Так как выживаемость нейронов, особенно чувствительных к ишемии, прямо пропорциональна времени, прошедшему с момента активации сигнальных каскадов апоптоза, в случае запуска его митохондриального пути шансы клеток выжить после инсульта невелики [34].

Ген-супрессор опухоли p53 человека (TP53) считается геном-кандидатом предрасположенности к шизофрении из-за своих функций в развитии нервной системы. Кроме того, он расположен в области хромосомы 17p13.1, регионе, мутации в которой часто связаны с шизофренией. В исследовании восьми полиморфизмов в этом гене у европейцев обнаружены связи между вариантами заболеваемостью шизофренией на примере 266 пациентов из Торонто, 264 здоровых людей и 162 нуклеарных семей из Португалии. С пациентами проводился структурный клинический опрос для уточнения анамнеза. Затем из образцов их крови была выделена ДНК и проведено генотипирование восьми полиморфизмов в TP53 [35]. Изучение полиморфизмов BstUI в экзоне 4 и MspI в сайтах рестрикции интрона 6 гена p53 методом ПЦР RFLP с использованием ДНК, выделенной из периферической крови у 100 пациентов с шизофренией, 100 — раком легких и 100 здоровых людей контрольной группы выявило существенные различия в частотах генотипов и аллелей [36].

При аутизме наблюдаются незначительное повышение уровней p53, в частности, в клетках Пуркинье и гранулярных клетках мозжечка, подтвержденное вестерн-блоттингом и иммуногистохимическим методом [11].

Кроме того, повышенная экспрессия факторов апоптоза, в том числе белка p53, обнаружена в мозге у пациентов с синдромом Дауна.

Исследования методом вестерн-блоттинга удаленного участка гиппокампа у пациентов с трудноизлечимой височной эпилепсией выявили активацию биохимических путей, связанных с p53-зависимым апоптозом. Уровни p53 у больных превышали таковые в контрольных образцах. Им-

муногистохимические методы показали локализацию p53 в ядрах нейронов и глии [37]. Методами иммунофлуоресценции, иммуногистохимии и вестерн-блоттинга отмечалась повышенная экспрессия p53 в ядрах нейронов области СА3 гиппокампа крыс, которым вводили пентилентетразол внутривентрикулярно, по сравнению с контрольной группой, при этом в зубчатой извилине гиппокампа таких различий не было [38]. В образцах мозга пациентов с фокальной лекарственно-устойчивой эпилепсией экспрессия проапоптотического белка p53 в коре головного мозга и белом веществе эпилептического очага и перифокальной зоны была повышена по сравнению с людьми без эпилепсии, что было оценено с помощью вестерн-блоттинга [39].

Подавление p53 прямыми или косвенными способами может уменьшить апоптоз, вызванный эпилептическими припадками. Перспективным направлением в настоящее время считается воздействие на микроРНК. МикроРНК широко экспрессируются в ЦНС и играют важную роль в патогенезе ряда неврологических расстройств, включая эпилепсию. Во множестве исследований отмечено нарушение экспрессии различных микроРНК в затронутых эпилепсией гиппокампе по сравнению с контролем [40].

Было бы ошибкой считать ингибирование p53 универсальным методом борьбы с эпилепсией, в ряде случаев может наступить ухудшение. Это показал эксперимент с эпилептическим статусом у мышей дикого типа и животных с недостатком p53. Анализ электроэнцефалограммы (ЭЭГ) во время эпилептического статуса, индуцированного введением каиновой кислоты в область миндалевидного тела, показал, что у генетически модифицированных мышей с дефицитом p53 судороги длились значительно дольше по сравнению с животными дикого типа по данным электроэнцефалографии. Тем не менее, гибель нейронов в зоне СА3 гиппокампа и неокортексе была значительно снижена через 72 часа у мышей с дефицитом p53. При этом повреждение гиппокампа у них было сопоставимым [41].

Болезнь Альцгеймера — форма деменции, которая проявляется потерей памяти, когнитивными дисфункциями, изменениями личности вследствие появления бляшек β -амилоида (A β), нейрофибриллярных клубков, нейровоспаления и потери нейронов. В мозге пациентов наблюдается повышенная экспрессия p53 в глиальных клетках и в нейронах височной коры. Он же участвует в дегенерации нейронов мозжечка и амилоидогенном процессе его старения. К основным признакам болезни Паркинсона относятся содержащие α -синуклеин тельца Леви, утрата дофаминергических нейронов чёрной субстанции и атрофия серого вещества. При посмертном исследовании мозга больных в нём обна-

руживается высокое содержание p53. P53 участвует в патогенезе семейных форм болезни. Сверхэкспрессия p53 ослабляет митохондриальный перенос Ca²⁺, вызывая дисфункцию митохондрий и прогрессирующее заболевание. Активация p53 в ответ на нейродегенеративный стресс тесно связана с дегенерацией дофаминергических нейронов, сопровождающейся митохондриальной дисфункцией, выработкой АФК, аномальной агрегацией белков и нарушением аутофагии [42].

Болезнь Гентингтона — наследственное заболевание нервной системы, результат умножения САG повтора свыше 36 копий в открытой рамке считывания гена HTT, кодирующего белок гентингтин с неизвестной функцией. Для этой болезни характерно позднее проявление. Атрофия полосатого тела и потеря нейронов приводит к появлению психиатрических симптомов. Мутантный белок M-Htt присоединяется к p53 и усиливает ядерный p53 и транскрипционную активность. Ингибирование p53 и усиление активности SIRT1 ресвератролом являются важными механизмами нейропротекции в борьбе с симптомами болезни согласно результатам исследования экспрессии miR-34a, b и c у мышей линии R6/2 в мозге, печени и скелетных мышцах [43].

p53 можно рассматривать как основной фактор нейродегенерации, вызванной метамфетамином [44].

Таким образом, для описанных заболеваний нервной системы (эпилепсии, шизофрении, расстройствах аутистического спектра, болезни Альцгеймера и Гентингтона и др.) характерна патологическая гибель нейронов и глиальных клеток, в основном путём апоптоза, и p53 играет здесь ведущую роль (Рис. 3). Экспериментальные данные указывают на него как на перспективную мишень для лекарственных препаратов, но в каждом отдельном случае требуется дополнительное исследование, так как существуют другие механизмы апоптоза, кроме p53-зависимого, и другие формы гибели клеток. Подавление апоптоза при эпилепсии, например, может способствовать выживанию aberrантных нейронов, прогрессированию болезни и развитию лекарственной устойчивости, либо привести клетки на более опасный путь некроза.

Bcl-2 и апоптоз нейронов

В 1988 году было обнаружено, что белок Bcl-2 (B Cell Lymphoma/Leukaemia 2) массой 26 кДа способствует развитию злокачественных опухолей, не давая их клеткам погибнуть, но при этом не усиливая пролиферацию. Единственным белком, с которым Bcl-2 имел гомологию, был белок вируса Эпштейна-Барр (EBV), известный как BHRF1. Появление молекулярных технологий в 1970-х и 1980-х годах имело решающее значение для исследований

функции Bcl-2, а клонирование мышинового гомолога Bcl-2 в 1987 году позволило начать его исследование на животных. Ген *Bcl-2* был идентифицирован в результате исследования хромосомной транслокации t(14;18), которая обнаруживается почти во всех фолликулярных лимфомах [45].

Впоследствии было показано, что экспрессия Bcl-2 может защищать клетки от стресса, вызванного различными факторами, в числе которых тепловой шок, различные цитотоксические агенты, такие как метотрексат, и ионизирующее излучение. Затем были открыты и другие белки со сходным строением. Белки семейства Bcl-2 эволюционно консервативны и имеют общие домены гомологии Bcl-2 (BH). Гены Bcl-2 возникли, по-видимому, у предка многоклеточных до разделения стрекающих и двустороннесимметричных животных и были идентифицированы даже у пластинчатых и губок, при этом их нет и не было у гребневилов, а некоторые нематоды их вторично утратили. Семейство Bcl-2 состоит из двух групп белков, одна из которых имеет α -спиральную складку Bcl-2 и присутствует у губок, пластинчатых, стрекающих и двустороннесимметричных животных, а вторая — BH3 отсутствует у пластинчатых и губок [46].

Функционально их можно разделить на антиапоптотические, проапоптотические и дивергентные (BH3). Проапоптотические Bax-подобные белки создают поры во внешней мембране мито-

хондрий, что приводит к высвобождению цитохрома c в цитоплазму, активации каспаз и, далее, к гибели клеток (рис. 2). Антиапоптотические белки, как Bcl-2, связывают и ингибируют подмножество доменов BH3, непосредственно вызывая олигомеризацию Bax или BAK. Группа BH3 объединяет белки со слабовыраженной гомологией последовательностей по сравнению с Bcl-2 [47]. Многие из этих белков широко распространены и экспрессируются в нервной системе развивающихся и взрослых организмов.

Из-за первоначально обнаруженной способности Bcl-2 защищать клетки от гибели часто забывают, что это обширное семейство белков, которые также играют важную роль в поддержании функций клеток, не связанных с апоптозом. К ним относятся участие в регуляции таких процессов, как продолжение клеточного цикла, работа митохондрий, аутофагия, внутриклеточная концентрация кальция, метаболизм глюкозы и липидов, а также развёрнутый белковый ответ на различные стимулы. В дополнение к этим установленным альтернативным функциям делаются дальнейшие открытия, обнаруживающие все новые функции данного белка. Из-за этого усиление или уменьшение экспрессии Bcl-2 не всегда напрямую соотносится с уровнями апоптоза и нужно рассматривать другие белки и их молекулярные пути [48].

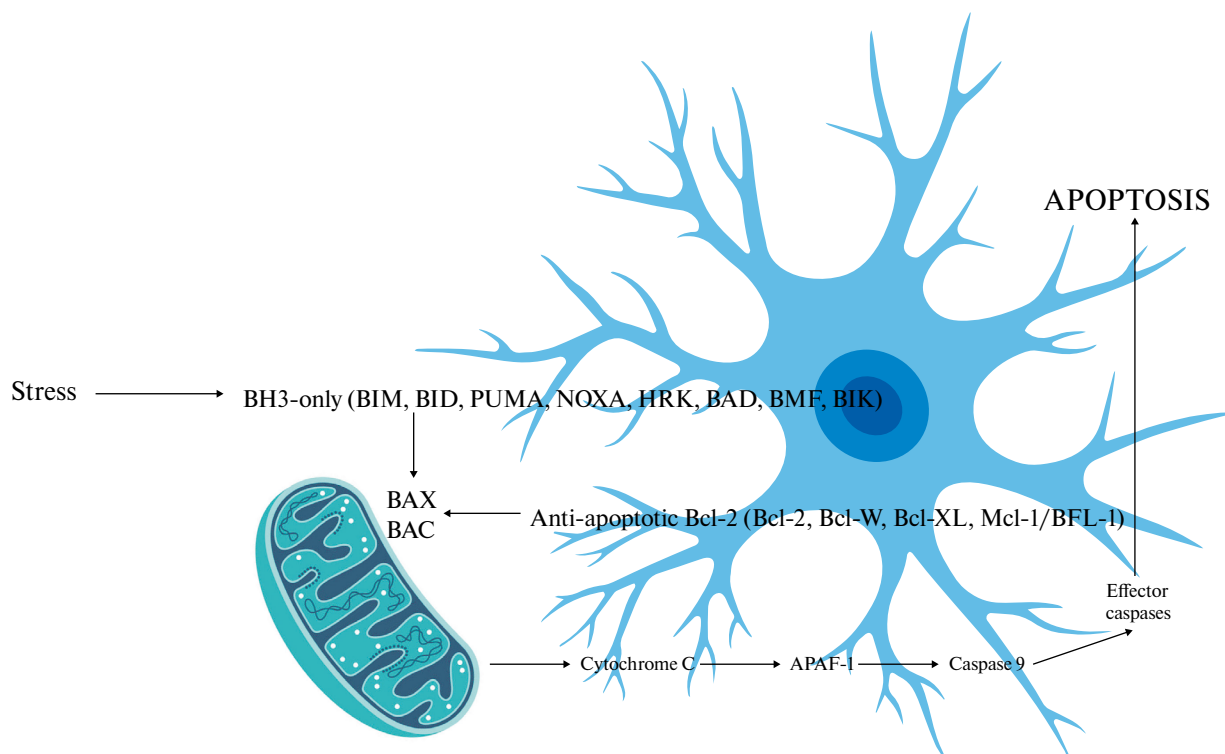


Рис. 2. Роль белков семейства Bcl-2 в апоптозе нейронов.

Bcl-2 играет двойную роль в поддержании динамического баланса между выживанием и гибелью раковых клеток. Было показано, что Bcl-2 задерживает переход фазы G0/G1 в S, регулируя митохондриальные метаболические пути для производства более низких уровней АТФ и АФК. Однако подробные молекулярные механизмы, с помощью которых Bcl-2 регулирует клеточный цикл, остаются неизвестными. Влияние Bcl-2 на регуляцию клеточного цикла было обнаружено путём мониторинга экспрессии Bcl-2 и p27. Протеомный анализ клеток, сверхэкспрессирующих Bcl-2, выявил 169 белков с повышенным уровнем экспрессии и 120 белков с пониженным уровнем с диапазоном отклонения от нормы в 1,5 раза. В основном они связаны с работой рибосом и окислительным фосфорилированием. Дифференциально экспрессируемые белки, участвующие в окислительном фосфорилировании, объясняют большую часть эффектов Bcl-2. Bcl-2 потенциально действует на уровне трансляции, оказывая влияние на белки или ферменты дыхательной цепи митохондрий и рибосомы, тем самым регулируя клеточный цикл. Однако детальные механизмы не прямой регуляции клеточного цикла Bcl-2 неясны [49]. Уклонение от апоптоза посредством сверхэкспрессии Bcl-2 вместе с бесконтрольным делением было признано отличительной чертой злокачественных опухолей.

Показана физиологическая роль Bcl-2 и Bcl-x в выживании нейронов. Они защищают нейроны от целого спектра токсических воздействий [50]. Bcl-2 широко экспрессируется в развивающемся и зрелом мозге, где участвует в регуляции путей окислительного стресса [51]. Несмотря на высокие уровни экспрессии мРНК и белка Bcl-2 как в клетках-предшественниках нейронов, так и в постмитотических нейронах эмбрионального мозга, дефицит Bcl-2 не вызывает каких-либо необратимых изменений и развитие идёт нормально, без значительного усиления запрограммированной гибели нейронов. При дефиците Bcl-2 наблюдается усиленная потеря мотонейронов, симпатических нейронов и сенсорных нейронов в раннем постнатальном периоде, оценка экспрессии Bcl-2 проводилась иммуногистохимическим методом [52]. В постнатальном периоде уровень Bcl-2 снижается в большинстве областей мозга, за исключением тех, где продолжается нейрогенез, но и там он падает с возрастом. Помимо нейронов, здесь он также экспрессируется микроглией. В периферической нервной системе его экспрессия остаётся высокой на протяжении всей жизни [53].

Однако экспрессия Bcl-2 изменяется при многих состояниях, для которых характерна быстрая или отсроченная гибель нейронов, а также нейродегенерация. Во многих случаях описано снижение

уровней антиапоптотических белков Bcl-2 с увеличением уровней проапоптотических белков или без него в поражённых областях мозга. В других случаях при тех же патологических состояниях описывается повышенная экспрессия антиапоптотических генов и их белков, что может просто отражать реакцию выжившей популяции клеток [54].

Активация сигнального пути ERK1/2/CREB/BCL-2 противомаларийным препаратом артемизином улучшала состояние переживших ишемический инсульт мышей. Артемизинин ослаблял выработку АФК, потерю мембранного потенциала митохондрий, снижал концентрацию медиаторов апоптоза, окислительного стресса и нейровоспаления, а также ускорял восстановление двигательных функций у животных. Данные были получены на клетках линии PC12 и C57BL/6J (E18), а также на биоптатах нервной ткани мышей линии C57BL/6J. Оценка производилась с помощью анализа жизнеспособности (МТТ — колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток), цитотоксичности, оценки апоптоза с помощью окрашивания Hoechst 33342, FACS, также оценивали активность каспазы-3, внутриклеточных АФК с помощью DCFH-DA, измерения митохондриального мембранного потенциала, вестерн-блоттинга, окрашивания по Нисслю и анализа TUNEL [55]. С помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией было также показано, что микроРНК-21 (miP-21) снижала гибель нейронов, защищала выжившие клетки от ишемического повреждения, что подтверждено TUNEL, и улучшала неврологические функции за счёт ингибирования передачи сигналов p53/Bcl-2/Bax [56].

Антиапоптотический белок Bcl-2 был первым регуляторным фактором апоптоза, изученным у больных шизофренией с помощью вестерн-блоттинга и иммуноферментного анализа. Исследования выявили сниженные на более чем 25% уровни Bcl-2 в височной коре головного мозга при шизофрении по сравнению с контролем. Более того, Bcl-2 обладает независимыми от апоптоза нейротрофическими свойствами на уровне дендритов. В совокупности эти данные позволяют предположить, что низкие уровни Bcl-2 могут способствовать снижению плотности коры при шизофрении. Соотношение Bax/Bcl-2 при шизофрении обычно увеличено на 50% по сравнению с контрольной корой. Считалось, что более высокое соотношение Bax/Bcl2 отражает более высокую восприимчивость к проапоптотическим стимулам, но полноценно запуститься апоптозу не дают низкие уровни каспазы-3 и -9. При шизофрении обнаружены изменения экспрессии 12 из 44 апоптотических генов. Из них семь имели повышенную регуляцию, четыре из которых были проапоптотическими (JNK, каспаза-2, Bid, Rip) и три — ан-

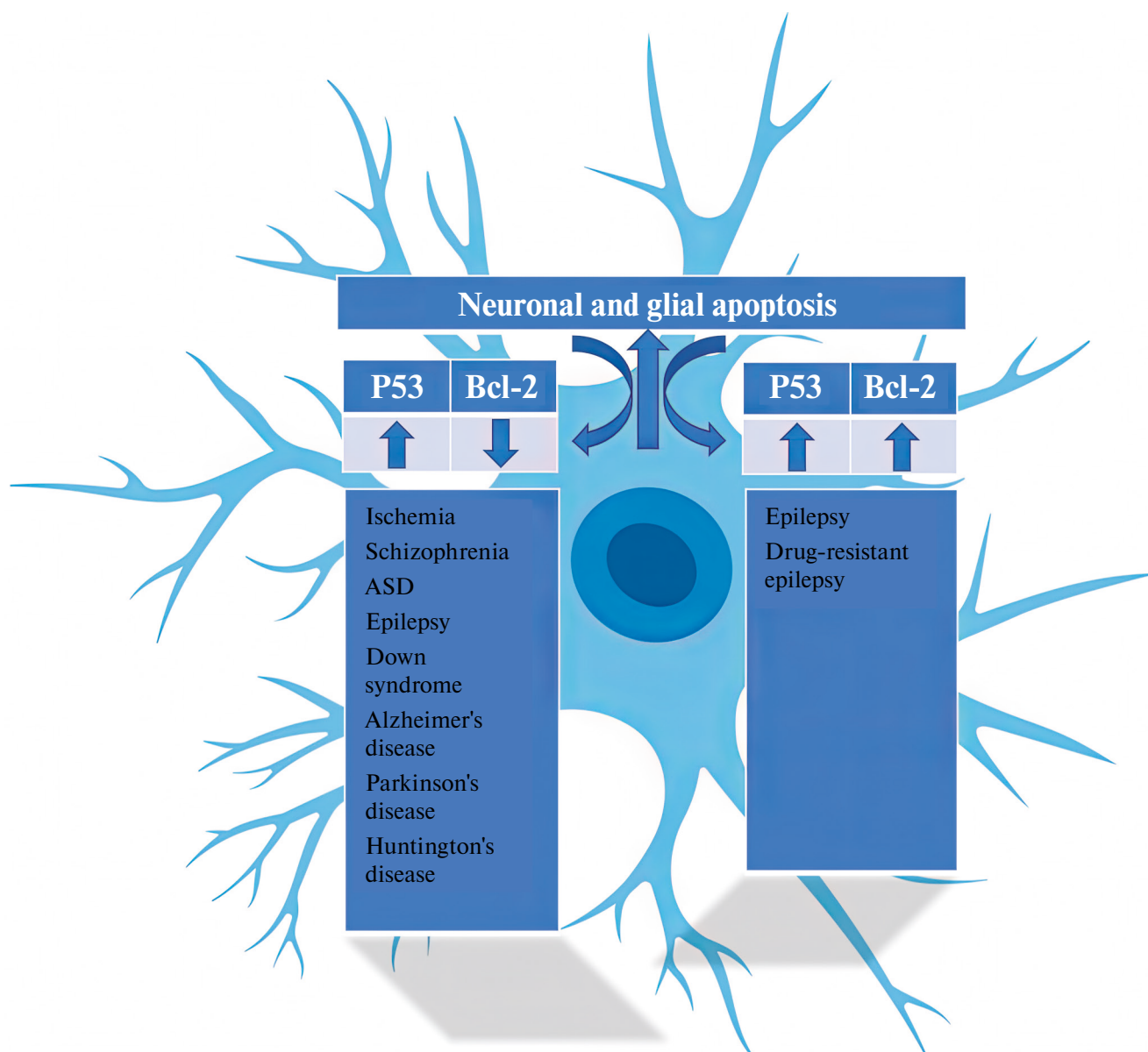


Рис. 3. Изменения уровней p53 и Bcl-2 при различных заболеваниях нервной системы.

тияпоптотическими (Bcl-2, Bcl-X, MDM-2). Из пяти генов с пониженной регуляцией все были проапоптотическими (Бах, каспаза-8, гранзим В, MEKK1, с-тус) [7].

Сообщалось о снижении уровня Bcl-2 в образцах мозжечка, лобной и теменной коры больных аутизмом [11].

Низкая экспрессия Bcl-2 отмечалась у пациентов с большим депрессивным расстройством, не получавших лечения. Изучение полиморфизмов в его гене у 178 пациентов с резистентной к лечению депрессией, 612 пациентов с поддающейся лечению, а также 725 здоровых людей из контрольной группы подтверждает гипотезу о том, что Bcl-2 мо-

жет играть важную роль в определении результатов лечения антидепрессантами, и этот результат может иметь диагностическое значение [57].

В нескольких исследованиях сообщалось о повышении уровней Bcl-2 в материале височных долей пациентов с эпилепсией, как взрослых, так и детей, особенно в случае фармакорезистентной эпилепсии. Изучение тканей коры пациентов с мезиальной височной эпилепсией демонстрирует, что повышенные уровни проапоптотических белков Бах и каспаза-9 и повышенные уровни антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, связаны с активацией внутреннего пути апоптоза, который опосредован чрезмерным высвобождением глутамата

и повышенным сродством N-метил-D-аспаратных рецепторов (NMDARs) к нему. Анализ методом вестерн-блоттинга ткани височной коры головного мозга показал значительное увеличение уровней белка Bcl-2 у людей с лекарственно-устойчивыми формами эпилепсии. Также экспрессия Bcl-2 положительно связана с продолжительностью, частотой и тяжестью эпилептических припадков [58]. Кроме Bcl-2, в поражённом эпилепсией мозге наблюдается усиленная экспрессия другого антиапоптотического белка — Bcl-xL. Для этого, используя вестерн-блоттинг и иммуногистохимию, авторы оценили экспрессию bcl-2, bcl-xL, bax, каспазы-1 и каспазы-3 в образцах височной коры у пациентов, перенесших операцию височной лобэктомии по поводу некупируемой эпилепсии ($n = 19$). Неэпилептическая посмертная ткань из банка мозга служила в качестве контроля ($n = 6$) [59]. Неизвестно, является ли это защитной реакцией, хотя экспериментальное введение Bcl-2 защищает нейроны и глиальный компонент от апоптоза. Повреждение головного мозга после судорог может быть причиной появления ряда белков в спинномозговой жидкости или плазме. Повышенные уровни в сыворотке крови Bcl-2, высвобождающегося после гибели нейронов либо вследствие периферических реакций на судороги, были зафиксированы у детей с трудноизлечимой височной эпилепсией и коррелировали с продолжительностью заболевания, его тяжестью и частотой судорог. Также было обнаружено, что IQ больных детей ниже, чем в контрольной группе, и отрицательно коррелирует с уровнем Bcl-2 в сыворотке. В данном случае уровни Bcl-2 в сыворотке являются хорошим маркером тяжести судорог и нарушения когнитивных функций. В настоящее время неизвестно, оказывает ли повышенный уровень Bcl-2 в сыворотке пациентов какой-либо защитный эффект на мозг [60]. По данным исследования сыворотки крови 65 пациентов с эпилепсией и 30 здоровых добровольцев, высокие уровни Bcl-2 связаны с когнитивной дисфункцией, отмечавшейся у 18 пациентов. Время и частота эпилептических припадков у пациентов с когнитивной дисфункцией были достоверно выше, чем у пациентов без таковой. Когнитивную функцию оценивали с помощью Монреальской формы когнитивной оценки, и в течение 6 ч после приступа брались анализы крови для измерения скорости гидролиза сывороточного аденозинтрифосфата (АТФ), аденозиндифосфата (АДФ), аденозинмонофосфата (АМФ), активности фосфодиэстеразы (ФДЭ) и уровней сывороточного NSE, S100B и Bcl-2 [61].

Уровни Bcl-2 положительно коррелируют с продолжительностью эпилепсии, тяжестью приступов и их частотой, притом у пациентов с неконтролируемыми приступами они выше, что показало изуче-

ние сыворотки крови методом иммуноферментного анализа у 30 детей и подростков (средний возраст 8.03 и 14.49 года) с идиопатической эпилепсией фокальной или генерализованной. При этом они были сопоставимы у пациентов с разными типами приступов. Помимо антиапоптотического белка Bcl-2, эта же закономерность наблюдалась у проапоптотического белка Fas [62]. Нужно отметить, что многие заболевания ЦНС сопровождаются судорожными припадками, не только эпилепсия (прионные заболевания, синдром Дауна, некоторые виды деменции и др.), и каждый приступ может приводить к выраженной нейродегенерации [63, 64].

Насколько эффективно Bcl-2 выполняет свою функцию, неясно, однако анализ его экспрессии при склерозе гиппокампа вследствие височной эпилепсии показал, что увеличение соотношения Bcl-2/Bax в нейронах и глиальных клетках в образцах гиппокампа 27 пациентов с лекарственно-устойчивой височной эпилепсией, где белки интереса выявляли иммуногистохимическим методом, не предотвращает экспрессию активной каспазы-3 глией и гранулярными нейронами, но в полях СА активная каспаза-3 не обнаруживалась [65]. В настоящее время при эпилепсии доступные противосудорожные препараты ограничены по своим механизмам действия и воздействуют лишь на симптомы эпилепсии, не затрагивая её причин, в большинстве случаев, остающихся в тени, особенно если заболевание уже устойчиво к лекарствам. Однако в основе патогенеза эпилепсии, независимо от причин, лежат общие механизмы, включающие в себя нарушение экспрессии различных апоптоз-ассоциированных молекул, элементы нейровоспаления, пересекающиеся с другими патологическими состояниями, например, злокачественными новообразованиями и аутоиммунными заболеваниями. Воздействие на аналогичные механизмы при раке привело к разработке новых способов лечения, несмотря на не меньшую лекарственную устойчивость и скорость её приобретения изменёнными дисфункциональными клетками. Тот же подход может оказаться эффективным при эпилепсии.

Экспрессия Bcl-2 снижена при различных нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, а уровни проапоптотических членов этого семейства, таких как Bax, напротив, высоки как в посмертных образцах от пациентов, так и в моделях трансгенных животных [18].

Анализ литературы позволяет предположить, что Bcl-2 не играет в головном мозге столь значимой роли, и его экспрессия снижается в процессе онтогенеза, в отличие от периферической нервной системы. При многих заболеваниях (шизофрения, расстройства аутистического спектра, нейродеге-

неративные заболевания и др.) отмечено снижение уровня экспрессии Bcl-2 (рис. 3). При эпилепсии же многие авторы наблюдают повышение уровней Bcl-2 как в мозге, так и в сыворотке крови и спинномозговой жидкости (рис. 3). Таким образом, можно предположить, что белок Bcl-2 как терапевтическая мишень менее перспективен, чем p53.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гибель нейронов и глиальных клеток широко распространена в норме и патологии, и имеет большое значение для функционирования нервной системы из-за ограниченной способности к пролиферации взрослых нейронов млекопитающих, в том числе человека. Механизмы апоптоза при различных патологиях ЦНС, как, например, инсульт и болезнь Альцгеймера, недостаточно изучены, поэтому в настоящее время нет эффективных методов и средств нейропротекции при патологии.

Анализ данных литературы показывает, что в основе различных заболеваний нервной системы лежат общие механизмы дисрегуляции апоптоза с чрезмерной активацией проапоптотических белков, таких как p53, и снижением экспрессии антиапоптотических, обеспечивающих выживание клеток, как Bcl-2, а также дефектами митохондрий. Выявление этих общих молекулярных механизмов может помочь разработать эффективные методы лечения и снижения последствий множества заболеваний, от депрессии до эпилепсии и деменций. Однако, по данным исследований, эти закономерности не являются абсолютными и не работают в некоторых случаях, что ставит вопросы о роли апоптоза и наличии не связанных с p53 и Bcl-2 механизмов, отвечающих за выживание и гибель клеток.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование обзора (А.А.К. и Е.Д.Б.), сбор и анализ литературных данных (А.А.К.

и Е.Д.Б.), написание и редактирование манускрипта (А.А.К. и Е.Д.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stoeckli ET* (2012) What does the developing brain tell us about neural diseases? *Eur J Neurosci* 35: 1811–1817. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08171.x>
2. *Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC* (2018) Neuronal Cell Death. *Physiol Rev* 98: 813–880. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>
3. *Bazhanova ED, Kozlov AA, Litovchenko AV* (2021) Mechanisms of Drug Resistance in the Pathogenesis of Epilepsy: Role of Neuroinflammation. A Literature Review. *Brain Sci* 11: 1–13. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050663>
4. *Uzdensky AB* (2019) Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis* 24: 687–702. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01556-6>
5. *Tuo Q-Z, Zhang S-T, Lei P* (2022) Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. *Med Res Rev* 42: 259–305. <https://doi.org/10.1002/med.21817>
6. *Mao R, Zong N, Hu Y, Chen Y, Xu Y* (2022) Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Neurosci Bull* 38: 1229–1247. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00859-0>
7. *Jarskog LF* (2006) Apoptosis in schizophrenia: pathophysiologic and therapeutic considerations. *Curr Opin Psychiatry* 19: 307–312. <https://doi.org/10.1097/01.yco.0000218603.25346.8f>
8. *Ahmed Mohamed Nabil Helaly AMH, El Din Ghorab DS* (2023) Schizophrenia as metabolic disease. What are the causes? *Metab Brain Dis* 38: 795–804. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01147-6>
9. *Dong D, Zielke HR, Yeh D, Yang P* (2018) Cellular stress and apoptosis contribute to the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Autism Res* 11: 1076–1090. <https://doi.org/10.1002/aur.1966>
10. *Wei H, Alberts I, Li X* (2014) The apoptotic perspective of autism. *Int J Dev Neurosci* 36: 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.04.004>
11. *Feit R, Hillary RF, Price DJ, Lawrie SM* (2021) The neuropathology of autism: A systematic review of post-mortem studies of autism and related disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 129: 35–62. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.07.014>
12. *Scaini G, Mason BL, Diaz AP, Jha MK, Soares JC, Trivedi MH, Quevedo J* (2023) Dysregulation of mitochondrial dynamics, mitophagy and apoptosis in major depressive disorder: Does inflammation play a role? *Mol Psychiatry* 27: 1095–1102. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01312-w>
13. *Zhao B, Fan Q, Liu J, Yin A, Wang P, Zhang W* (2022) Identification of Key Modules and Genes Associated with Major Depressive Disorder in Adolescents. *Genes (Basel)* 13: 464. <https://doi.org/10.3390/genes13030464>

14. *Bazhanova ED, Kozlov AA* (2022) Mechanisms of apoptosis in drug-resistant epilepsy. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 122: 43–50 (In Russ).
<https://doi.org/10.17116/jnevro202212205143>
15. *Henshall DC, Simon RP* (2005) Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1557–1572.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600149>
16. *Zhao Y, Jiang W-J, Ma L, Lin Y, Wang X-B* (2020) Voltage-dependent anion channels mediated apoptosis in refractory epilepsy // *Open Med (Wars)* 15: 745–753.
<https://doi.org/10.1515/med-2020-0113>
17. *Wang W, Ma Y-M, Jiang Z-L, Gao Z-W, Chen W-G* (2021) Apoptosis-antagonizing transcription factor is involved in rat post-traumatic epilepsy pathogenesis. *Exp Ther Med* 21: 290.
<https://doi.org/10.3892/etm.2021.9721>
18. *Erekat NS* (2022) Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clin Anat* 35: 65–78.
<https://doi.org/10.1002/ca.23792>
19. *Medrano S, Scrable H* (2005) Maintaining appearances — the role of p53 in adult neurogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 828–833.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.194>
20. *Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan M, Harris C, Hainaut P* (2022) The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19: 607–614.
<https://doi.org/10.1002/humu.10081>
21. *Ho T, Tan B, Lane D* (2020) How the other half lives: what p53 does when it is not being a transcription factor. *Int J Mol Sci* 21:E13.
<https://doi.org/10.3390/ijms21010013>
22. *Matoba S, Kang Ju-G, Patino W, Wrang A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley P, Bunz F, Hwang P* (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650–1653.
<https://doi.org/10.1126/science.1126863>
23. *Feng Z, Levine A* (2010) The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol* 20: 427–434.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.03.004>
24. *Jiang Y, Armstrong D, Albrecht U, Atkins C, Noebels L, Eichele G, Sweatt D, Beaudet, A* (1998) Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* 21: 799–811.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80596-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80596-6)
25. *Mattison M, Gary D, Chan S, Duan W* (2001) Perturbed endoplasmic reticulum function, synaptic apoptosis and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp* 67: 151–162.
<https://doi.org/10.1042/bss0670151>
26. *Crumrine R, Thomas A, Morgan P* (1994) Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 887–891.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.119>
27. *D'Sa-Eipper C, Leonard J, Putcha G, Zheng T, Flavell R, Rakic P, Kuida K, Roth K* (2001) DNA damage-induced neural precursor cell apoptosis requires p53 and caspase 9 but neither Bax nor caspase 3. *Development* 128: 137–146.
<https://doi.org/10.1242/dev.128.1.137>
28. *Morrison R, Wenzel H, Kinoshita Y, Robbins C, Donehower L, Schwartzkroin P* (1996) Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J Neurosci* 16: 1337–1345.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-04-01337.1996>
29. *Xu X, Yang D, Wyss-Coray T, Yan J, Gan L, Sun Y, Mucke L* (1999) Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7547–7552.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7547>
30. *Chatterjee N, Walker G* (2017) Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 58: 235–263.
<https://doi.org/10.1002/em.22087>
31. *Gareau J, Lima C* (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 861–871.
<https://doi.org/10.1038/nrm3011>
32. *Uberti D, Belloni M, Grilli M, Spano P, Memo M* (2009) Induction of tumoursuppressor phosphoprotein p53 in the apoptosis of cultured rat cerebellar neurones triggered by excitatory amino acids. *Eur. J. Neurosci* 10: 246–254.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00042.x>
33. *Li H, Zhang Z, Li H, Pan X, Wang Y* (2023) New Insights into the Roles of p53 in Central Nervous System Diseases. *Int J Neuropsychopharmacol* 26: 465–473.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyad030>
34. *Almeida A, Sánchez-Morán I, Rodríguez C* (2021) Mitochondrial-nuclear p53 trafficking controls neuronal susceptibility in stroke. *IUBMB Life* 73: 582–591.
<https://doi.org/10.1002/iub.2453>
35. *Ni X, Trakalo J, Valente J, Azevedo MH, Pato MT, Pato CN, Kennedy JL* (2005) Human p53 tumor suppressor gene (TP53) and schizophrenia: case-control and family studies. *Neurosci Lett* 388: 173–178.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.06.050>
36. *Ozbey U, Yüce H, Namlı M, Elkıran T* (2011) Investigation of Differences in P53 Gene Polymorphisms between Schizophrenia and Lung Cancer Patients in the Turkish Population. *Genet Res Int*: 483851.
<https://doi.org/10.4061/2011/483851>
37. *Engel T, Murphy BM, Schindler CK, Henshall DH* (2007) Elevated p53 and lower MDM2 expression in hippocampus from patients with intractable temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 77: 151–156.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.09.001>
38. *Ding D-X, Tian F-F, Guo J-L, Li K, He J-X, Song M-Y, Li L, Huang X* (2014) Dynamic expression patterns of ATF3 and p53 in the hippocampus of a pentylenetetrazole-induced kindling model. *Mol Med Rep* 10: 645–651.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2256>
39. *Sokolova TV, Zbrodskaya YM, Litovchenko AV, Paramonova NM, Kasumov VR, Kravtsova SV, Skiteva EN, Sitovskaya DA, Bazhanova ED* (2022) Relationship between Neuroglial Apoptosis and Neuroinflammation in the Epileptic Focus of the Brain and in the Blood of Patients with Drug-Resistant Epilepsy. *Int J Mol Sci* 23: 12561.
<https://doi.org/10.3390/ijms232012561>
40. *Martinez B, Peplow PV* (2023) MicroRNAs in mouse and rat models of experimental epilepsy and potential therapeutic targets. *Neural Regen Res* 18: 2108–2118.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.369093>

41. Engel T, Tanaka K, Jimenez-Mateos EM, Caballero-Caballero A, Prehn JHM., Henshall DC (2010) Loss of p53 results in protracted electrographic seizures and development of an aggravated epileptic phenotype following status epilepticus. *Cell Death Dis* 1: e79. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.55>
42. Luo Q, Sun W, Wang Y-F, Li J, Li D-W (2022) Association of p53 with Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2022: 6600944. <https://doi.org/10.1155/2022/6600944>
43. Talebi M, Talebi M, Kakouri E, Farkhondeh T, Pourbagher-Shahri AM, Tarantilis PA, Samarghandian S (2021) Tantalizing role of p53 molecular pathways and its coherent medications in neurodegenerative diseases. *Int J Biol Macromol* 172: 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.042>
44. Li K, van Delft MF, Dewson G (2021) Too much death can kill you: inhibiting intrinsic apoptosis to treat disease. *EMBO J* 40: e107341. <https://doi.org/10.15252/embj.2020107341>
45. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226: 1097–1099. <https://doi.org/10.1126/science.6093263>
46. Suraweera CD, Banjara S, Hinds MG, Kvansakul M (2022) Metazoans and Intrinsic Apoptosis: An Evolutionary Analysis of the Bcl-2 Family. *Int J Mol Sci* 23: 3691. <https://doi.org/10.3390/ijms23073691>
47. Choudhury S (2019) A comparative analysis of BCL-2 family. *Bioinformation* 15: 299–306. <https://doi.org/10.6026/97320630015299>
48. Glab J, Cao Z, Puthalakath H (2020) Bcl-2 family proteins, beyond the veil. *Int Rev Cell Mol Biol* 351:1–22. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.12.001>
49. Du X, Xiao J, Fu X, Xu B, Han H, Wang Y, Pei X (2021) A proteomic analysis of Bcl-2 regulation of cell cycle arrest: insight into the mechanisms. *J Zhejiang Univ Sci B* 22: 839–855. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000802>
50. Merry DE, Korsmeyer SJ (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 20: 245–267. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.245>
51. Hollville E, Romero SE, Deshmukh M (2019) Apoptotic cell death regulation in neurons. *FEBS J* 286: 3276–3298. <https://doi.org/10.1111/febs.14970>
52. Akhtar RS, Ness JM, Roth KA (2004) Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1644: 189–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.10.013>
53. Merry DE, Korsmeyer SJ (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 20: 245–267. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.245>
54. Shacka JJ, Roth KA (2005) Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration by members of the Bcl-2 family: therapeutic implications. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568007053005127>
55. Peng T, Li S, Liu L, Yang C, Farhan M, Chen L, Su Q, Zheng W (2022) Artemisinin attenuated ischemic stroke induced cell apoptosis through activation of ERK1/2/CREB/BCL-2 signaling pathway in vitro and in vivo. *Int J Biol Sci* 18: 4578–4594. <https://doi.org/10.7150/ijbs.69892>
56. Yan H, Huang W, Rao J, Yuan J (2021) miR-21 regulates ischemic neuronal injury via the p53/Bcl-2/Bax signaling pathway. *Aging (Albany NY)* 13: 22242–22255. <https://doi.org/10.18632/aging.203530>
57. Zhang C, Wu Z, Hong W, Wang Z, Peng D, Chen J, Yuan C, Yu S, Xu L, Fang Y (2014) Influence of BCL2 gene in major depression susceptibility and antidepressant treatment outcome. *J Affect Disord* 155: 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.11.010>
58. Vega-García A, Orozco-Suárez S, Villa A, Rocha L, Feria-Romero I, Alonso Vanegas MA, Guevara-Guzmán R (2021) Cortical expression of IL1-β, Bcl-2, Caspase-3 and 9, SEMA-3a, NT-3 and P-glycoprotein as biological markers of intrinsic severity in drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1758: 147303. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147303>
59. Henshall DC, Clark RS, Adelson PD, Chen M, Watkins SC, Simon RP (2000) Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology* 55: 250–257. <https://doi.org/10.1212/wnl.55.2.250>
60. Kilany A, Raouf ERA, Gaber AA, Aloush TK, Aref HA, Anwar M, Henshall DC, Abdulghani MO (2012) Elevated serum Bcl-2 in children with temporal lobe epilepsy. *Seizure* 21: 250–253. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.01.004>
61. Zhang Y, Zhang S, Ji Y, Yang X, Liu P, Yu G (2020) Relationship of serum ATPase activity and the levels of neuron-specific enolase, S100B and B-cell lymphoma/leukemia-2 with cognitive function after epileptic seizure. *Ann Palliat Med* 9: 3366–3372. <https://doi.org/10.21037/apm-20-1494>
62. El-Hodhod MA, Tomoum HY, Al-Aziz MMA, Samaan SM (2006) Serum Fas and Bcl-2 in patients with epilepsy. *Acta Neurol Scand* 113: 315–321. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00592.x>
63. Neri S, Mastroianni G, Gardella E, Aguglia U, Rubboli G (2022) Epilepsy in neurodegenerative diseases. *Epileptic Disord* 24: 249–273. <https://doi.org/10.1684/epd.2021.1406>
64. Corniello C, Dono F, Evangelista G, Consoli S, De Angelis S, Cipollone S, Liviello D, Polito G, Melchiorre S, Russo M, Granzotto A, Anzellotti F, Onofri M, Thomas A, Sensi S (2023) Diagnosis and treatment of late-onset myoclonic epilepsy in Down syndrome (LOMEDS): A systematic review with individual patients' data analysis. *Seizure* 109: 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2023.05.017>
65. Toscano EC de B, Vieira ELM., Portela ACDC, Reis JJJ, Caliar MV, Giannetti AV, Gonçalves AP, Siqueira JM, Suetomoto CK, Leite REP, Nitrini R, Teixeira AL, Rachid MA (2019) Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy. *Neuropathology* 39: 348–357. <https://doi.org/10.1111/neup.12592>

ROLE OF APOPTOSIS-ASSOCIATED PROTEINS P53 AND BCL-2 IN THE PATHOGENESIS OF NERVOUS SYSTEM DISEASES

E. D. Bazhanova^{a, b, #} and A. A. Kozlov^a

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

^b *Golikov Research Center of Toxicology, Saint-Petersburg, Russia*

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

Diseases of the central nervous system occupy a leading place, along with cardiovascular and oncological diseases, and the proportion of patients suffering from diseases of the nervous system is increasing as the population ages. This group of diseases includes acute conditions, such as ischemic stroke, and chronic multifactorial diseases — Alzheimer's and Parkinson's diseases, epilepsy, etc. The development of specific methods for their treatment is difficult, and these drugs are not very effective. Almost all brain diseases are based on common mechanisms such as oxidative stress, inflammation and neuronal death. Most often, cells die by apoptosis due to an imbalance between pro-apoptotic and anti-apoptotic factors. This work examines two of them: the apoptosis-promoting transcription factor and tumor suppressor p53 and its opposing B-cell lymphoma protein Bcl-2. The choice of these proteins for study is due to the fact that both proteins are key regulators of apoptosis and are important in the pathogenesis of nervous diseases, since neurons are not highly proliferating cells. The p53 protein is involved in the regulation of many genes responsible for DNA repair, apoptosis, and other biochemical cellular processes; this is especially important when studying neuronal pathology. Bcl-2 suppresses apoptosis in various cells, including neurons, by controlling mitochondrial membrane permeability and inhibiting caspases. In diseases, its expression can either increase, for example, in the case of malignant tumors, or decrease, as in the case of neurodegenerative processes. It has been established that p53 and Bcl-2 are in close interaction in the process of regulating apoptosis; their ratio may be an important prognostic factor. The purpose of this work was to assess the role of these proteins in the pathogenesis of various diseases of the nervous system, and to search for general patterns of changes in their expression and coexpression.

Keywords: apoptosis, p53, Bcl-2, pathogenesis, nervous system diseases, epilepsy

УРОВЕНЬ ТРИПТОФАНОВЫХ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ ДИНАМИКОЙ РАЗВИТИЯ ОЖИРЕНИЯ

© 2024 г. О. П. Шатова^{1,2,*}, И. М. Колесникова^{1,3}, Е. М. Ягодкина¹,
С. С. Кайдошко¹, А. М. Гапонов⁴, С. А. Румянцев^{1,3}, А. В. Шестопалов^{1,3}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия

⁴ Научный центр цифровой и трансляционной биомедицины
“Центр молекулярного здоровья”, Москва, Россия

* e-mail: shatova.op@gmail.com

Поступила в редакцию 30.01.2024 г.

После доработки 24. 05.2024 г.

Принята к публикации 26.05.2024 г.

Высокая заболеваемость ожирением у детей является крайне актуальной проблемой современной системы здравоохранения многих стран. Отмечается рост заболеваемости ожирением у детей и в России, что опасно не только развитием соматических сопутствующих патологий, но и нарушением социальной адаптации детей. Вне сомнения, поиск ранних биохимических показателей стабилизации и прогресса ожирения в более старшем возрасте имеет очень важное значение для формирования группы риска и своевременной профилактики развития ожирения и его осложнений. В нашем исследовании было показано, что при оценке различной динамики развития ожирения необходимо учитывать пол ребенка, что игнорируется во многих случаях. В качестве индикатора, ассоциированного со стабилизацией или прогрессированием ожирения у девочек, может рассматриваться снижение сывороточной концентрации серотонина. Тогда как у мальчиков, склонных к стабилизации и/или прогрессированию ожирения, в качестве маркера-предиктора может выступать сниженный сывороточный уровень индол-3-акрилата. Также потенциальным показателем стабилизации/прогресса ожирения у детей обоих полов может быть повышенный уровень индол-3-карбоксальдегида в кале.

Ключевые слова: детское ожирение, метаболизм триптофана, динамика развития ожирения, серотонин, индол-3-акрилат

DOI: 10.31857/S0044452924040022, **EDN:** YQNJMC

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается эпидемия ожирения среди детей. В Российской Федерации в 2020 г. в возрастной группе 1–14 лет насчитывалось 90,7 тыс. детей с впервые установленным ожирением, в то время как в 2005 г. данный показатель составлял 55,8 тыс. детей [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) с 1975 года общая распространенность ожирения во всем мире выросла почти в три раза. Среди детей и подростков в возрасте от 5 до 19 лет распространенность избыточного веса и ожирения возросла еще более резко: избыточный вес увеличился с всего лишь 4% в 1975 г. до более 18% в 2016 г., а ожирение увеличилось с менее 1% в 1975 г. до 6% в 2016 г. у девочек и 8% у мальчиков. Это эквивалентно более чем 340 миллионам детей

и подростков с избыточным весом и 124 миллионам детей и подростков, страдающих ожирением во всем мире в 2016 г. [2]. Известно, что детское и подростковое ожирение может прогрессировать во взрослом возрасте [3]. Также оно является фактором риска многих хронических заболеваний, включая сахарный диабет 2 типа (СД2Т), артериальную гипертензию и другие сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) [4]. Детское и подростковое ожирение связано с более высокой смертностью во взрослом возрасте [5], а на основании данных исследования “Глобального бремени болезней” в период с 2020 по 2030 г. прогнозируется увеличение общей смертности (на 42,7%), связанной именно с ожирением [6]. Кроме того, повышенная распространенность нарушений гликолипидного метаболизма у детей

и подростков имеет четко установленную корреляцию с ССЗ и СД2Т во взрослом возрасте [7].

Общеизвестно, что триптофановые сигнальные молекулы играют важную роль в физиологии организма человека. Так, кинуреновая и хинолиновая кислоты имеют нейропротекторное значение, серотонин модулирует циркадные ритмы и аппетит [8], индол-3-ацетат и индол-3-лактат регулируют обмен липидов, а индол-3-пропионат влияет на проницаемость кишечника [9]. Кинуренин является доминантным метаболитом обмена триптофана и его уровень зачастую связывают с развитием ожирения [10]. Существует целый ряд работ, которые демонстрируют вовлеченность обмена триптофана и его метаболитов в патогенез ожирения [11], метаболического синдрома [12], СД2Т [13]. Вовлеченность триптофановых метаболитов в развитие ожирения обусловлена очень многими факторами, начиная от регуляции пищевого поведения и подавления синтеза жирных кислот в печени [8] и заканчивая пока не очень хорошо понятными функциями индол-3-акрилата. Производные триптофана играют важную роль в таких осях регуляции, сформированными микробиотическими сигнальными молекулами, как “кишечник — жировая ткань” и “кишечник — мозг” [14]. Существует три ключевых направления метаболизма триптофана в организме человека: индолный, серотониновый и кинурениновый пути (рис. 1).

Абсолютно все метаболиты обмена триптофана являются сигнальными молекулами [15] и выполняют как протективные функции при развитии ожирения, так и негативно влияют на метаболический профиль больных с ожирением [9]. Так как ожирение — это хроническое вялотекущее воспаление, то у больных с ожирением интенсифицируется кинурениновый путь благодаря срабатыванию так называемого “кинуренинового переключателя” [16]. Повышается как содержание самого кинуренина в сыворотке крови, так и некоторых его метаболитов на фоне повышения провоспалительных цитокинов [10]. Также было показано, что Z-показатель индекса массы тела (ИМТ) у детей и масса жира в организме положительно коррелируют с концентрацией кинуренина и активностью регуляторного фермента кинуренинового обмена — индол-2,4-диоксигеназой (IDO) и отрицательно коррелируют с содержанием серотонина в сыворотке крови [4]. Однако не проводился анализ в зависимости от пола детей [4].

Вне сомнения наличие специфичных и чувствительных маркеров прогрессирования ожирения у детей во взрослом возрасте могло бы иметь важное значение как для выделения группы риска и проведения профилактических мероприятий, так и для понимания патогенетических звеньев. Некоторыми

исследователями были предложены различные биохимические маркеры прогнозирования клинического течения детского/подросткового ожирения. Так, определение уровня сывороточного холестерина и С-реактивного белка могут быть полезными в плане прогнозирования прогрессии ожирения у детей во взрослом возрасте [17]. При этом данные показатели являются более специфичным отражением развития метаболического синдрома и эндотелиальной дисфункции. Также к прогностическим факторам риска развития ожирения у младенцев (в исследовании дети до 2-х лет) являются высокие уровни инсулина и лептина и низкий уровень адипонектина в сыворотке крови [3]. Было показано, что у детей с ожирением в возрасте 9–19 лет в сыворотке крови были повышены уровни триптофана и кинуренина и напротив снижена концентрация серотонина [4]. Однако не было изучено можно ли по уровню данных метаболитов прогнозировать прогресс или регресс ожирения через несколько лет.

Целью нашего исследования было оценить содержание метаболитов обмена триптофана у детей с ожирением в зависимости от пола ребенка и стабилизации/прогресса или регресса заболевания через четыре года.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые группы

В одноцентровом проспективном исследовании на базе Детской городской больницы № 1, г. Ростов-на-Дону; ООО “Центр Молекулярного Здоровья”, г. Москва; Казанского (Приволжского) федерального университета и Российского национального исследовательского университета им. Н.И. Пирогова в период 2019–2020 гг. приняли участие 100 здоровых детей и 91 ребенок с ожирением I–III степени без наличия метаболического синдрома. SDS ИМТ для группы здоровых детей был меньше 1, тогда как у детей с ожирением SDS ИМТ соответствовал 2.0–3.9. Возраст детей был от 10 до 17 лет. В контрольной группе было 39 девочек и 61 мальчик. В группе ожирения (диагноз на основании клинических рекомендаций “Ожирение у детей”) [18] было 45 девочек и 46 мальчиков. Критерии включения: подписанное родителями добровольное информированное согласие и отсутствие приема анти-, про- и пребиотиков за 3 мес. до включения в исследование. Критерии исключения были: тяжелые соматические заболевания (хроническая сердечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, хроническая почечная недостаточность), любые заболевания желудочно-кишечного тракта, а также все острые заболевания. В группах наблюдения не было детей

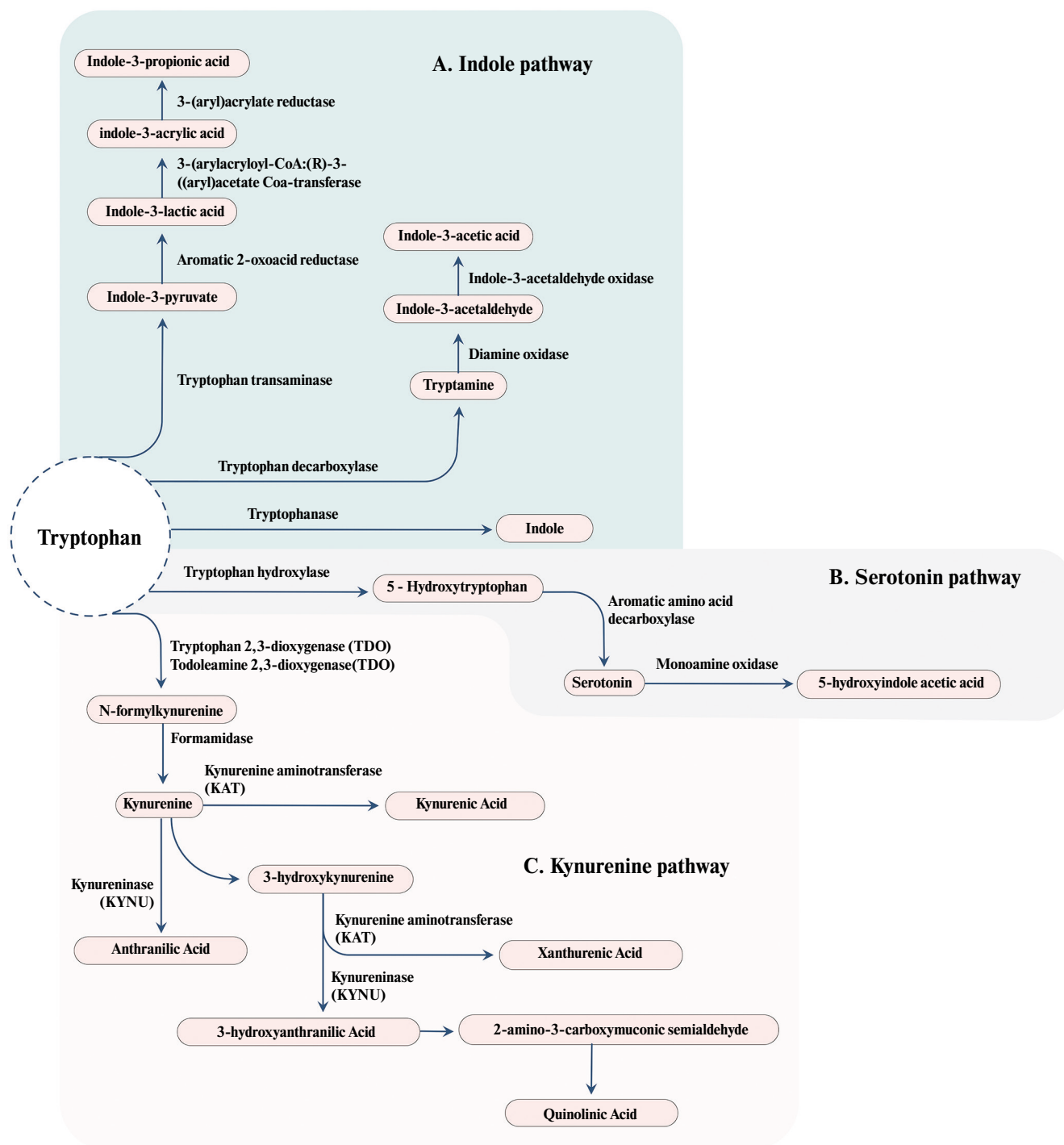


Рис. 1. Индольный, серотониновый и кинурениновый пути метаболизма триптофана [4, 8].

с преждевременным половым созреванием. Всем детям с ожирением была рекомендована низкокалорийная диета и комплекс физических упражнений. Спустя 4 г. была проведена оценка SDS ИМТ, на основании которой оценивалась динамика течения ожирения, в зависимости от которой пациенты с ожирением были распределены на две группы —

“Регрессия” ($n = 66$) и “Стабилизация/прогрессирование” ($n = 25$). Под регрессией ожирения понимали — снижение степени ожирения спустя 4 г. или уменьшение SDS ИМТ ниже 2.0 (избыточная или нормальная масса тела) для I-III степеней ожирения. Сохранение той же степени ожирения, которое было установлено исходно в 2019-2020 гг.

расценивалось как стабилизация ожирения. При увеличении степени ожирения спустя 4 г. ожирение оценивалось как прогрессирующее. У всех обследуемых было проведено изучение анамнеза (с целью анализа критериев включения и исключения из исследования), жалоб на момент обращения, проведен общеклинический осмотр (антропометрия для определения SDS ИМТ) и отбор образцов кала и крови.

Биохимический анализ

Для подготовки пробы сыворотки крови к 100 мкл сыворотки добавляли внутренний стандарт (2-гидроксиникотиновую кислоту), осаждали белки ацетонитрилом, супернатант упаривали и перерастворяли в 10% метаноле в воде с добавлением 0.02% аскорбиновой кислоты.

Образцы кала лиофилизировали до сухого остатка, затем образец массой около 5 мг экстрагировали 50%-ным раствором метанола в воде с добавлением внутреннего стандарта и аскорбиновой кислоты. Пробоподготовку проводили следующим образом: 100 мкл каловых спиртовых экстрактов (калибраты или КК) смешивали с раствором внутреннего стандарта 10 мкл исходного раствора, 10 мкг/мл раствора 2-гидроксиникотиновой кислоты и 400 мкл ацетонитрила. Затем смесь встряхивали, центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 об/мин и выпаривали досуха в вакуумном центрифужном испарителе при 37°C. Остатки далее восстанавливали 100 мкл раствора 0.02% аскорбиновой кислоты в 10%-м метаноле. После центрифугирования при 13000 об/мин в течение 10 мин ($g = 9.840$) образец анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. Затем 5 мкл экстракта вводили в жидкостный хроматограф для последующего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографическое разделение проводили с использованием аналитической колонки Discovery PFP HS F5 (2.1×150 мм; 3 мкм, Supelco Inc, St. Louis, Missouri, США). Для детектирования использовали масс-спектрометрический детектор на основе тройного квадруполя Agilent 6470 (Agilent inc.; США) MRM и электрораспылительной ионизацией. Характеристические для каждого соединения родительские и дочерние ионы для режима MRM, а также параметры ионизации и диссоциации оптимизировали с использованием стандартов исследуемых метаболитов. Полученный сигнал обрабатывали при помощи программного обеспечения Masshunter (Agilent inc.; США). Температуру колонки и скорость потока устанавливали на 40°C и 0.4 мл/мин соответственно. Подвижные фазы состоят из 0.1% водного раствора муравьиной кислоты (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиента была следующей: 0 мин — 1% В; 4 мин — 10% В; 9 мин — 90% В; 10 мин — 90% В; 10.1 — 1% В; 12 мин — 1% В. Ионизация элек-

трораспылением работала в положительном режиме. Основные параметры МС были следующими: температура газа — 300°C; расход газа — 8 л/мин; газ для распыления — 20 фунтов на квадратный дюйм; нагреватель защитного газа — 300; расход защитного газа — 10 л/мин; капиллярное напряжение — 3500 кВ. Расчет концентраций метаболитов проводили методом внутреннего стандарта (2-гидроксиникотиновая кислота). Стандарты определяемых соединений готовили с использованием искусственной матрицы, содержащей бычий сывороточный альбумин и хлорид натрия. В матрицу добавляли исследуемые метаболиты и проводили подготовку согласно методике анализа.

Методика была валидирована по показателям селективности, линейности, точности, воспроизводимости, матричному эффекту и стабильности аналита. Валидацию проводили в соответствии с руководством по валидации биоаналитических методов FDA [19].

Методы статистического анализа

Накопление, корректировка, систематизация исходной информации полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2021. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программного обеспечения MedCalc® Statistical Software v. 22.013 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium). Все полученные массивы данных были проверены на нормальность распределения критерием Шапиро–Уилка. Ввиду преобладания ненормального распределения были использованы методы непараметрического анализа. Сравнительный анализ выполнялся с расчетом критерия Краскала–Уоллиса. При отвержении нулевой гипотезы ($p < 0,05$) автоматически выполнялся апостериорный тест по методу Conover для попарного сравнения групп. Для описания полученных данных использовали медиану и межквартильный размах (Me [Q1;Q3]).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У детей с ожирением вне зависимости от дальнейшей динамики были выявлено повышение содержания кинуренина в кале при исходном обследовании (табл. 1). В крови наблюдалось увеличение концентрации индол-3-лактата, индол-3-ацетата, кинуреновой, антраниловой и ксантуреновой кислот, также вне зависимости от дальнейшей динамики ожирения. Единственной специфической характеристикой детского ожирения с перспективой дальнейшей стабилизации и/или прогрессирования было повышение уровня индол-3-карбоксальдегида в кале по сравнению с детьми без ожирения.

В литературе существуют различные данные о содержании триптофановых метаболитов у детей в норме и при ожирении. Кроме того, есть единичные работы, которые демонстрируют, что содержание метаболитов обмена триптофана различается у детей разного пола [20]. В связи с чем далее мы разделили исследуемые группы на подгруппы по половому признаку и провели их сравнительный анализ. Так у девочек с ожирением вне зависимости от его дальнейшей динамики наблюдалось повышение концентрации кинуренина в кале, а также уровня индол-3-лактата, кинуреновой и ксантуреновой

кислот в крови (табл. 2), что совпадает с данными объединенных групп (мальчиков и девочек). Особенностью детского ожирения у девочек независимо от перспективы его развития было повышение уровня индол-3-акрилата в крови. Кроме того, у девочек, для которых была характерна дальнейшая стабилизация или прогрессирование ожирения, была повышена концентрация антранилата в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой.

Ключевой особенностью ожирения у девочек, склонного к стабилизации или прогрессированию ожирения, был сниженный уровень серотонина

Таблица 1. Содержание метаболитов триптофанового обмена в кале и крови у детей в норме и при регрессии или стабилизации/прогрессии ожирения

	Контроль (<i>n</i> = 100) Возраст 13 [11; 15]	Регрессия (<i>n</i> = 66) Возраст 13 [11; 14]	Стабилизация и прогрессирование (<i>n</i> = 25) Возраст 14 [12; 15]
нмоль/г	Кал		
Индол	422 [150; 988]	406 [226; 622]	290 [164; 621]
3-гидроксииндолацетат	0.601 [0.282; 1.63]	1.02 [0.397; 1.83]	1.24 [0.419; 2.26]
Индол-3-акрилат	0.105 [0.045; 0.182]	0.106 [0.047; 0.196]	0.144 [0.048; 0.197]
Индол-3-карбоксальдегид	3.44 [1.73; 6.46]	4.69 [1.75; 7.92]	4.75 [1.81; 9.67]
Индол-3-лактат	0.555 [0.238; 1.39]	0.733 [0.346; 1.442]	0.685 [0.233; 1.86]
Индол-3-пропионат	10.7 [4.84; 21.4]	14.5 [6.34; 35.3]	14.9 [6.53; 28.5]
Индол-3-ацетат	8.29 [4.12; 15.8]	10.1 [4.23; 23.2]	8.25 [4.41; 26.1]
Триптамин	0.293 [0.083; 1.27]	0.518 [0.133; 1.58]	0.170 [0.070; 1.53]
Кинуренин	0.281 [0.156; 0.497]	0.357 [0.195; 0.761]*	0.600 [0.272; 1.17]*
Кинуреновая кислота	4.02 [1.04; 15.5]	3.77 [0.934; 12.59]	8.53 [3.05; 20.1]
Антраниловая кислота	0.235 [0.129; 0.390]	0.242 [0.139; 0.411]	0.229 [0.103; 0.429]
Хинолиновая кислота	3.21 [1.49; 6.55]	2.32 [1.39; 4.49]	4.56 [1.76; 8.11]
Ксантуреновая кислота	0.585 [0.142; 3.07]	0.345 [0.178; 3.73]	1.29 [0.199; 3.51]
нмоль/л	Кровь		
3-гидроксииндолацетат	64.1 [52.5; 78.9]	63.3 [51.4; 78.3]	62.7 [48.5; 70.9]
Индол-3-акрилат	2.24 [1.25; 3.96]	3.04 [1.36; 6.77]	2.25 [0.681; 3.93]
Индол-3-карбоксальдегид	31.1 [25.7; 43.6]	36.8 [28.1; 45.1]	37.6 [30.4; 54.9]*
Индол-3-лактат	436 [327; 556]	578 [376; 779]*	605 [459; 967]*
Индол-3-пропионат	743 [437; 1124]	853 [372; 1428]	770 [338; 1359]
Индол-3-ацетат	987 [808; 1245]	1201 [829; 1793]*	1485 [899; 2082]*
Индол-3-бутират	3.52 [2.21; 4.51]	3.95 [2.33; 5.87]	4.60 [2.55; 7.02]
Триптамин	0.751 [0.615; 0.866]	0.782 [0.611; 0.894]	0.693 [0.615; 0.833]
Кинуренин	2469 [1981; 3018]	2569 [2127; 2988]	2409 [2133; 2841]
Кинуреновая кислота	16.5 [12.6; 20.9]	21.3 [15.9; 27.9]*	24.7 [18.9; 33.2]*
Антраниловая кислота	23.4 [16.1; 33.1]	33.6 [22.8; 41.9]*	38.2 [27.7; 50.7]*
Хинолиновая кислота	62.9 [45.9; 83.9]	58.7 [43.1; 85.9]	59.9 [45.9; 80.9]
Ксантуреновая кислота	2.94 [2.18; 4.61]	4.58 [2.29; 7.12]*	5.28 [2.80; 6.81]*
Серотонин	936 [662; 1270]	905 [672; 1208]	644 [560; 1033]

Примечание: * — отличие статистически значимо по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

Таблица 2. Содержание метаболитов триптофанового обмена в кале и крови у девочек в норме и при регрессии или стабилизации/прогрессии ожирения через 4 г.

	Контроль (<i>n</i> = 39) Возраст 13 [11; 15]	Регрессия (<i>n</i> = 31) Возраст 13 [11; 14]	Стабилизация и прогрессирование (<i>n</i> = 14) Возраст 15 [14; 16]
нмоль/г	Кал		
Индол	254 [127; 925]	406 [258; 713]	381 [261; 644]
3-гидроксииндолацетат	0.466 [0.200; 1.04]	0.857 [0.351; 1.79]	1.05 [0.423; 1.71]
Индол-3-акрилат	0.089 [0.052; 0.166]	0.068 [0.032; 0.172]	0.145 [0.062; 0.209]
Индол-3-карбоксальдегид	3.99 [1.59; 6.36]	5.39 [2.02; 9.18]	3.82 [1.98; 5.71]
Индол-3-лактат	0.490 [0.226; 0.979]	0.576 [0.317; 1.46]	0.598 [0.347; 1.09]
Индол-3-пропионат	8.82 [3.86; 19.1]	13.5 [6.08; 37.9]	22.5 [8.61; 55.5]
Индол-3-ацетат	6.75 [4.76; 11.7]	8.39 [4.19; 19.3]	7.92 [3.67; 19.8]
Триптамин	0.353 [0.088; 1.47]	0.431 [0.135; 2.01]	0.163 [0.077; 0.430]
Кинуренин	0.209 [0.108; 0.411]	0.541 [0.209; 0.754]*	0.585 [0.254; 1.19]*
Кинуреновая кислота	3.24 [0.994; 10.9]	2.19 [0.931; 8.46]	8.76 [5.11; 20.6]
Антралиловая кислота	0.211 [0.128; 0.494]	0.272 [0.164; 0.469]	0.226 [0.110; 0.468]
Хинолиновая кислота	2.51 [1.18; 6.13]	1.80 [1.29; 3.08]	4.34 [1.95; 7.04]
Ксантуреновая кислота	0.487 [0.123; 1.38]	0.321 [0.187; 2.43]	1.34 [0.31; 3.98]
нмоль/л	Кровь		
3-гидроксииндолацетат	64.1 [51.6; 78.9]	66.2 [48.4; 75.5]	54.2 [43.5; 70.4]
Индол-3-акрилат	2.14 [0.934; 3.16]	3.73 [1.06; 5.85]*	3.17 [2.25; 7.28]*
Индол-3-карбоксальдегид	30.9 [26.0; 43.9]	35.9 [27.9; 41.4]	37.4 [33.2; 56.2]
Индол-3-лактат	353 [264; 435]	602 [362; 728]*	622 [526; 895]*
Индол-3-пропионат	752 [478; 111]	895 [455; 1435]	933 [308; 1935]
Индол-3-ацетат	1025 [794; 1370]	1142 [849; 1945]	1318 [1006; 1771]
Индол-3-бутират	4.06 [2.59; 5.01]	4.38 [2.27; 5.27]	4.21 [2.65; 5.74]
Триптамин	0.762 [0.646; 0.967]	0.775 [0.635; 0.899]	0.689 [0.640; 0.892]
Кинуренин	2361 [1837; 3189]	2560 [2068; 2951]	2403 [1864; 2617]
Кинуреновая кислота	17.1 [11.8; 20.6]	21.3 [16.4; 27.5]*	25.1 [20.2; 33.0]*
Антралиловая кислота	25.3 [18.3; 38.1]	31.8 [22.5; 42.6]	44.2 [30.2; 63.7]*
Хинолиновая кислота	62.6 [45.8; 73.6]	51.2 [39.1; 75.2]	58.6 [51.4; 80.7]
Ксантуреновая кислота	2.85 [2.05; 4.61]	4.13 [2.42; 6.91]*	4.58 [3.19; 6.51]*
Серотонин	967 [725; 1301]	934 [672; 1112]	650 [458; 836]*†

Примечание: * — отличие статистически значимо по сравнению с контролем ($p < 0.05$); † — отличие статистически значимо по сравнению с группой детей с ожирением с регрессией заболевания в перспективе ($p < 0.05$).

в крови, что отличало таких больных как от контрольной группы, так и от группы с ожирением у которых наблюдалась регрессия через 4 года.

Сравнение содержания метаболитов триптофана у мальчиков без ожирения и с разными динамиками ожирения в перспективе обнаружило, что при ожирении (вне зависимости от перспективы исхода) наблюдается повышение концентрации кинуреновой и антралиловой кислот в крови (табл. 3). От кон-

трольной группы ожирения у мальчиков, склонное к регрессии, отличала также концентрация ксантуреновой кислоты в крови. Ожирение со стабилизацией или прогрессированием в перспективе отличалось от контрольной группы уровнем сыровоточно-го индол-3-ацетата. Однако нас в большей степени интересовало исходное изменение каких-либо метаболитов для групп с различной динамикой развития ожирения. И нами установлено, что ключевой

Таблица 3. Содержание метаболитов триптофанового обмена в кале и крови у мальчиков в норме и при регрессии или стабилизации/прогрессии ожирения через 4 г.

	Контроль (<i>n</i> = 61) Возраст 12 [11; 14]	Регрессия (<i>n</i> = 35) Возраст 13 [11; 14]	Стабилизация и прогрессирование (<i>n</i> = 11) Возраст 13 [12; 14]
нмоль/г	Кал		
Индол	442 [170; 995]	406 [195; 571]	205 [149; 414]
3-гидроксииндолацетат	0.779 [0.371; 1.99]	1.09 [0.625; 2.09]	2.11 [0.448; 3.82]
Индол-3-акрилат	0.114 [0.041; 0.194]	0.135 [0.068; 0.211]	0.144 [0.038; 0.171]
Индол-3-карбоксальдегид	3.22 [1.96; 6.85]	3.46 [1.63; 6.23]	8.81 [1.66; 12.28]
Индол-3-лактат	0.695 [0.292; 1.63]	0.775 [0.43; 1.24]	1.25 [0.115; 3.26]
Индол-3-пропионат	11.8 [4.85; 22.6]	14.5 [6.40; 35.3]	9.36 [3.00; 20.2]
Индол-3-ацетат	9.53 [3.77; 19.8]	12.3 [5.20; 26.7]	19.1 [5.86; 45.8]
Триптамин	0.178 [0.082; 1.26]	0.518 [0.133; 1.33]	0.325 [0.053; 1.90]
Кинуренин	0.319 [0.168; 0.610]	0.354 [0.187; 0.875]	0.616 [0.282; 1.23]
Кинуреновая кислота	5.99 [1.05; 18.2]	7.55 [2.25; 14.7]	6.76 [0.503; 19.1]
Антраниловая кислота	0.252 [0.143; 0.360]	0.197 [0.133; 0.346]	0.252 [0.102; 0.472]
Хинолиновая кислота	3.56 [1.64; 7.27]	2.58 [1.43; 4.85]	4.59 [1.64; 8.97]
Ксантуреновая кислота	1.11 [0.148; 3.91]	0.741 [0.157; 4.60]	1.23 [0.078; 9.96]
нмоль/л	Кровь		
3-гидроксииндолацетат	64.1 [53.4; 78.9]	61.3 [52.9; 79.5]	63.9 [50.9; 71.7]
Индол-3-акрилат	2.59 [1.31; 4.56]	2.89 [1.55; 7.05]	0.884 [0.149; 2.08]*†
Индол-3-карбоксальдегид	32.3 [25.4; 40.1]	37.5 [31.1; 46.2]	43.3 [29.6; 52.8]
Индол-3-лактат	489 [401; 587]	530 [443; 871]	511 [400; 1108]
Индол-3-пропионат	737 [410; 1163]	783 [337; 1269]	534 [352; 1016]
Индол-3-ацетат	961 [834; 1219]	1236 [796; 1736]	1707 [897; 2512]*
Индол-3-бутират	3.04 [2.11; 4.01]	3.66 [2.38; 5.91]	5.62 [2.45; 7.15]
Триптамин	0.729 [0.600; 0.844]	0.786 [0.581; 0.889]	0.695 [0.563; 0.782]
Кинуренин	2515 [2089; 2919]	2569 [2136; 3159]	2409 [2172; 2934]
Кинуреновая кислота	16.3 [13.3; 20.9]	21.4 [15.5; 28.7]*	22.6 [18.2; 33.2]*
Антраниловая кислота	22.6 [15.6; 32.9]	34.3 [23.1; 40.5]*	34.7 [27.1; 42.9]*
Хинолиновая кислота	63.1 [46.6; 90.4]	62.2 [49.6; 94.4]	60.9 [42.4; 79.1]
Ксантуреновая кислота	3.13 [2.28; 4.79]	4.68 [2.13; 8.31]*	5.83 [2.26; 7.90]
Серотонин	894 [614; 1239]	830 [672; 1210]	645 [621; 1308]

Примечание: * — отличие статистически значимо по сравнению с контролем ($p < 0.05$); † — отличие статистически значимо по сравнению с группой детей с ожирением с регрессией заболевания в перспективе ($p < 0.05$).

особенностью, отличавшей ожирение у мальчиков склонное к стабилизации или прогрессированию, было снижение концентрации индол-3-акрилата в сыворотке крови. Подобная патохимическая особенность не только отличала ожирение с негативным прогнозом, но и была характерна только для мальчиков, тогда как у девочек ожирение приводило к повышению индол-3-акрилата в сыворотке крови. То есть, для различных полов установлено разнона-

правленное изменение данного триптофанового метаболита.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вне зависимости от дальнейшей динамики развития ожирения у детей обоих полов установили повышение уровня кинуренина, антраниловой, кинуреновой и ксантуреновой кислот в сыворотке крови. Логично предположить, что повышение

кинуруенина может приводить к гиперпродукции вышеперечисленных кислот, так как они являются нижестоящими метаболитами в кинуруениновом пути. Вполне вероятно, что детское ожирение, ассоциированное именно с избыточной продукцией кинуруенина. Что в свою очередь приводит не только к внутрикишечному повышению его содержания, но и к усилению абсорбции кинуруенина, его метаболизму в организме и, как следствие, повышению концентрации его метаболитов в сыворотке крови. Изменение концентрации метаболитов кинуруенина, но не его самого, в сыворотке крови может быть ассоциировано с гиперэкспрессией генов ферментов его метаболизма (таких как IDO1, KYNU, KAT и другие), что характерно и для взрослых лиц с ожирением [21]. Подобное наблюдение укладывается в предложенную нами концепцию “кинуруенинового переключателя” [16], который срабатывает при ожирении и характеризуется интенсификацией именно кинуруенинового пути утилизации триптофана на фоне провоспалительной стимуляции [22]. Таким образом данный “переключатель” срабатывает не только у взрослых, что было описано нами ранее, а и у детей. Повышение кинуруенина и кислот его производных нельзя рассматривать как показатели отличающие различные варианты течения ожирения, а лишь рассматривать как общеметаболическую характеристику детей с ожирением.

Следует отметить и активацию индольного пути обмена триптофана у детей с ожирением так как повышаются индол-3-лактат и индол-3-ацетат в сыворотке крови, но их повышение не позволяет нам прогнозировать течение ожирения. Полученные нами данные о повышении индол-3-ацетата, индол-3-лактата, антраниловой кислоты, кинуруеновой и ксантуруеновой кислот для детей с ожирением подтверждаются данными и других исследователей [23].

Особенностью детей со стабилизацией или прогрессом ожирения в перспективе (особенно у девочек) было повышение индол-3-карбоксальдегида в сыворотке крови. Другой исследовательской группой на мышинной модели было показано, что сывороточный индол-3-карбоксальдегид негативно ассоциирован с ожирением [24]. Возможно, выявленное нами повышение концентрации индол-3-карбоксальдегида может быть компенсаторной реакцией на другие факторы, опосредующие стабилизацию или прогрессирование ожирения, и безусловно требуются дополнительные исследования для выявления роли данного метаболита триптофана в патогенезе ожирения. Однако, при формировании группы риска для детей с ожирением возможно учитывать содержание ин-

дол-3-карбоксальдегида в сыворотке крови как потенциального предиктора стабилизации/прогресса ожирения у детей обоих полов.

Характерной особенностью ожирения у девочек с перспективой стабилизации или прогрессирования через четыре года было низкое содержание серотонина в сыворотке крови. Образование серотонина в организме, по всей видимости, зависит от женских половых гормонов и лептина, а может и других адипокинов. Следует отметить, что уровень лептина зависит от пола и резко повышается в пубертатном периоде [25] или при преждевременном половом созревании [26]. Серотонин продуцирует как микробиота кишечника, так и энтероциты [27]. Известно, что именно продукция серотонина в клетках кишечника является основным источником его для сыворотки крови [28]. При этом синтез серотонина клетками кишечника находится под влиянием сигнальных молекул кишечной микробиоты [29, 30]. Так, например, короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) — продукты микробиотического происхождения регулируют экспрессию триптофангидроксилазы (триптофан-5-монооксигеназы) в кишечнике, влияя на синтез серотонина [31]. В настоящее время, точно не известен вклад кишечной микробиоты в содержание сывороточного серотонина. Однако нами установлено, что нет статистически значимой разницы содержания серотонина в кале у здоровых детей и у детей с ожирением. Это позволяет нам предположить, что именно клетки кишечника и являются главными поставщиками серотонина в кровь, как об этом пишут некоторые исследователи [27]. Кроме того, снижение серотонина в сыворотке крови у девочек при ожирении с перспективой стабилизации или прогрессирования можно объяснить тем, что триптофан в кишечнике в большей степени шунтируется на кинуруениновый путь. Так при ожирении содержание кинуруенина в кале становится выше, а содержание серотонина в крови — ниже. Важно, что снижение серотонина, проявляющего анорексигенный эффект, будет приводить к повышению аппетита [22] и потенциально к развитию и/или прогрессированию ожирения. При этом известно, что низкий уровень серотонина снижает экспрессию окклюдина, что вполне логично ослабляет мукозальный барьер. Ослабление мукозального барьера приводит к увеличению проницаемости кишечника и развитию, так называемого, синдрома повышенной проницаемости кишечника. Последний был зарегистрирован у пациентов с диагнозом синдром раздраженного кишечника [32]. Таким образом, сниженная концентрация серотонина может опосредовать повышение проницаемо-

сти кишечной стенки, что является одним из патогенетических звеньев развития ожирения [33].

Особенностью ожирения, склонного к стабилизации и/или прогрессированию, у мальчиков было снижение сывороточной концентрации индол-3-акрилата. Индол-3-акрилат регулирует экспрессию гена муцина (*Muc2*), проявляет антиоксидантный и противовоспалительный эффект [34], что может позитивно отражаться на состоянии кишечной стенки. Кроме того, индол-3-акрилат является непосредственным предшественником индол-3-пропионата. Интересно, что индол-3-пропионат является одним из лигандов рецептора прегнана X (pregnane X receptor, PXR), связываясь с которым проявляет противовоспалительный эффект [35]. В целом PXR представляет собой рецептор для широкого спектра лигандов, включая и половые гормоны [36]. Было показано, что PXR обладает половым диморфизмом: для самок-мышей характерна сильная конститутивная роль PXR в поддержании экспрессии генов, вовлеченных в иммунный ответ, тогда как большинство чувствительных к микробиоте генов были PXR-зависимыми в печени у самцов, но не у самок [37]. При этом, взаимодействие микробиоты и PXR контролирует также метаболизм жирных кислот и, как следствие, липидный обмен [37]. Возможно, у мальчиков ввиду меньшего уровня женских половых гормонов, значение стимуляции PXR индол-3-пропионатом играет большую роль в контексте регуляции генов иммунного ответа и липидного обмена, чем у девочек. Истощение индол-3-акрилата, отмеченное нами у мальчиков с перспективой стабилизации или прогрессирования ожирения, может расцениваться как возможный фактор риска дальнейшего истощения сывороточного пула индол-3-пропионата, что приводит к недостаточно эффективной стимуляции PXR. Учитывая противовоспалительный эффект PXR и его роль в регуляции липидного обмена, нехватка его лигандов может быть одним из факторов стабилизации или прогрессирования ожирения у мальчиков.

ВЫВОДЫ

На сегодняшний день большинство исследований причин и метаболических проявлений ожирения сосредоточено на небольшом количестве прямых предикторов ожирения, а не на тестировании сложных моделей, которые рассматривают многофакторную природу происхождения ожирения на раннем этапе развития. В настоящее время отсутствуют какие-либо четкие биохимические прогностические критерии, предсказывающие течение ожирения у детей через несколько лет. При этом высоко специфическое прогнозирование могло бы

быть направлено на профилактику стабилизации и прогрессии ожирения в выявленных группах риска. Содержание метаболитов обмена триптофана в кале и/или крови детей больных ожирением может отражать потенциальный прогноз — будет ли регресс или прогресс заболевания через несколько лет. Проведенная нами работа указывает на то, что при поиске показателей динамики развития ожирения следует обязательно учитывать пол ребенка. В качестве индикатора, ассоциированного со стабилизацией или прогрессированием ожирения у девочек, может рассматриваться снижение сывороточной концентрации серотонина. У мальчиков, склонных к стабилизации или прогрессированию ожирения, в качестве такого показателя может выступать сниженный уровень индол-3-акрилата в сыворотке крови.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

О.П.Ш. — подготовка первичных данных, идея статьи и написание разделов статьи; Колесникова И.М.К. — статистическая обработка данных и написание разделов статьи; Е.М.Я. — статистическая обработка данных и написание разделов статьи; С.С.К. — написание разделов статьи, подготовка рисунков; А.М.Г. — подготовка первичных данных и консультирование; С.А.Р. — финальная правка статьи; А.В.Ш. — идея исследования и статьи, научное консультирование и финальная правка статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Локальным независимым этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России протокол № 186 от 26.06.2019 г. Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам научно — технологического развития от 20 апреля 2022 года № 075-15-2022-310.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Zdra-voohran-2021.pdf>
2. Drozd D, Alvarez-Pitti J, Wójcik M, Borghi C, Gabbianelli R, Mazur A, Herceg-čavrak V, Lopez-Valcarcel BG, Brzeziński M, Lurbe E, Wühl E (2021) Obesity and Cardiometabolic Risk Factors: From Childhood to Adulthood. *Nutrients* 13: 4176. <https://doi.org/10.3390/NU13114176>
3. Leerkes EM, Buehler C, Calkins SD, Shriver LH, Wideman L (2020) Protocol for iGrow (Infant Growth and Development Study): biopsychosocial predictors of childhood obesity risk at 2 years. *BMC Public Health* 20: 1912. <https://doi.org/10.1186/S12889-020-10003-0>
4. Lischka J, Schanzer A, Baumgartner M, de Gier C, Greber-Platzer S, Zeyda M (2022) Tryptophan Metabolism Is Associated with BMI and Adipose Tissue Mass and Linked to Metabolic Disease in Pediatric Obesity. *Nutrients* 14: 286. <https://doi.org/10.3390/NU14020286>
5. Lee EY, Yoon KH (2018) Epidemic obesity in children and adolescents: risk factors and prevention. *Front Med* 12: 658–666. <https://doi.org/10.1007/S11684-018-0640-1>
6. Chong B, Jayabaskaran J, Kong G, Chan YH, Chin YH, Goh R, Kannan S, Ng CH, Loong S, Kueh MTW, Lin C, Anand VV, Lee ECZ, Chew HSI, Tan DJH, Chan KE, Wang JW, Muthiah M, Dimitriadis GK, Hausenloy DJ, Mehta AJ, Foo R, Lip G, Chan MY, Mamas MA, le Roux CW, Chew NWS (2023) Trends and predictions of malnutrition and obesity in 204 countries and territories: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *EClinicalMedicine* 57: 101850. <https://doi.org/10.1016/J.ECLINM.2023.101850>
7. Zhao X, Niu Y, Zhao XL, Ruan HJ, Xiang Y, Wang LY, Feng Y, Tang QY (2023) Associations Between Serum TNF- α , IL-6, hs-CRP and GLMD in Obese Children and Adolescents: A Cross-Sectional Study. *Diabetes Metab Syndr Obes* 16: 3915–3923. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S434482>
8. Liaqat H, Parveen A, Kim SY (2022) Neuroprotective Natural Products' Regulatory Effects on Depression via Gut-Brain Axis Targeting Tryptophan. *Nutrients* 14: 3270. <https://doi.org/10.3390/NU14163270>
9. Shestopalov AV, Shatova OP, Zabolotneva AA, Gaponov AM, Moskaleva NE, Appolonova SA, Makarov VV, Yudin SM, Rumyantsev AG, Roumiantsev SA (2021) Coupling features of intestinal and serum indole pools in obesity. *Problems of Biological Medical and Pharmaceutical Chemistry* 24: 3–12. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-10-01>
10. Shestopalov A V., Shatova OP, Gaponov AM, Moskaleva NE, Appolonova SA, Tutelyan AV, Makarov VV, Yudin SM, Rumyantsev SA (2020) The study of tryptophan metabolite concentrations in blood serum and fecal extracts from obese children. *Biomed Khim* 66: 494–501. <https://doi.org/10.18097/PBMC20206606494>
11. Di Ciaula A, Bonfrate L, Khalil M, Garruti G, Portincasa P (2023) Contribution of the microbiome for better phenotyping of people living with obesity. *Rev Endocr Metab Disord* 24: 839–870. <https://doi.org/10.1007/S11154-023-09798-1>
12. Ambroselli D, Masciulli F, Romano E, Catanzaro G, Besharat ZM, Massari MC, Ferretti E, Migliaccio S, Izzo L, Ritieni A, Grosso M, Formichi C, Dotta F, Frigerio F, Barbiera E, Giusti AM, Ingallina C, Mannina L (2023) New Advances in Metabolic Syndrome, from Prevention to Treatment: The Role of Diet and Food. *Nutrients* 15: 640. <https://doi.org/10.3390/NU15030640>
13. Kozieł K, Urbanska EM (2023) Kynurenine Pathway in Diabetes Mellitus—Novel Pharmacological Target? *Cells* 12: 460. <https://doi.org/10.3390/CELLS12030460>
14. Hou Y, Li J, Ying S (2023) Tryptophan Metabolism and Gut Microbiota: A Novel Regulatory Axis Integrating the Microbiome, Immunity, and Cancer. *Metabolites* 13: . <https://doi.org/10.3390/METABO13111166>
15. Shatova OP, Shestopalov AV (2023) Tryptophan Metabolism: A New Look at the Role of Tryptophan Derivatives in the Human Body. *Biology Bulletin Reviews* 13: 81–91. <https://doi.org/10.1134/S2079086423020068>
16. Shestopalov AV, Shatova OP, Karbyshev MS, Gaponov AM, Moskaleva NE, Appolonova SA, Tutelyan AV, Makarov VV, Yudin SM, Roumiantsev SA (2022) “Kynurenine switch” and obesity. *Bulletin of Siberian Medicine* 20: 103–111. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-4-103-111>
17. Correa-Burrows P, Rogan J, Blanco E, East P, Lozoff B, Gahagan S, Burrows R (2021) Resolving early obesity leads to a cardiometabolic profile within normal ranges at 23 years old in a two-decade prospective follow-up study. *Sci Rep* 11: 18927. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-97683-9>
18. Peterkova VA, Bezlepikina OB, Bolotova NV, Bogova EA, Vasyukova OV, Girsh YV, Kiyaev AV, Kostrova IB, Malievs-kiy OA, Mikhailova EG, Okorokov PL, Petryaykina EE, Taranushenko TE, Khranova EB (2021) Clinical guidelines “Obesity in children”. *Problems of Endocrinology* 67: 67–83. <https://doi.org/10.14341/probl12802>
19. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. September 2013. Revision 1. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration
20. Tan KML, Tint MT, Kothandaraman N, Yap F, Godfrey KM, Lee YS, Tan KH, Gluckman PD, Chong YS, Chong MFF, Eriksson JG, Cameron-Smith D (2022) Association of plasma kynurenine pathway metabolite concentrations with metabolic health risk in prepubertal Asian children. *Int J Obes (Lond)* 46: 1128–1137. <https://doi.org/10.1038/S41366-022-01085-4>
21. Favennec M, Hennart B, Caiazzo R, Leloir A, Yengo L, Verbanck M, Arredouani A, Marre M, Pigeire M, Bessede A, Guillemin GJ, Chinetti G, Staels B, Pattou F, Balkau B, Allorge D, Froguel P, Poulain-Godefroy O (2015) The ky-

- nurenine pathway is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation. *Obesity* (Silver Spring) 23: 2066–2074.
<https://doi.org/10.1002/OBY.21199>
22. *Tan KML, Tint MT, Kothandaraman N, Michael N, Sathananthan SA, Velan SS, Fortier MV, Yap F, Tan KH, Gluckman PD, Chong YS, Chong MFF, Lee YS, Godfrey KM, Eriksson JG, Cameron-Smith D* (2022) The Kynurenine Pathway Metabolites in Cord Blood Positively Correlate with Early Childhood Adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 107: e2464–e2473.
<https://doi.org/10.1210/CLINEM/DGAC078>
 23. *Zhang S, Dang Y* (2022) Roles of gut microbiota and metabolites in overweight and obesity of children. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 994930.
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.994930/PDF>
 24. *Shan S, Qiao Q, Yin R, Zhang L, Shi J, Zhao W, Zhou J, Li Z* (2023) Identification of a Novel Strain *Lactobacillus Reuteri* and Anti-Obesity Effect through Metabolite Indole-3-Carboxaldehyde in Diet-Induced Obese Mice. *J Agric Food Chem* 7: 3239–3249.
<https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.2C05764>
 25. *Misch M, Puthanveetil P* (2022) The Head-to-Toe Hormone: Leptin as an Extensive Modulator of Physiologic Systems. *Int J Mol Sci* 23: 5439.
<https://doi.org/10.3390/IJMS23105439>
 26. *Zurita-Cruz JN, Villasis-Keever MA, Manuel-Apolinar L, Damasio-Santana L, Garrido-Magaña E, Rivera-Hernández A de J* (2023) Leptin/adiponectin ratio as a prognostic factor for increased weight gain in girls with central precocious puberty. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1101399.
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1101399/PDF>
 27. *Dicks LMT* (2022) Gut Bacteria and Neurotransmitters. *Microorganisms* 10: 1838.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10091838>
 28. *Mawe GM, Hoffman JM* (2013) Serotonin signalling in the gut — functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 473–486.
<https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2013.105>
 29. *Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY* (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161: 264–276.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.02.047>
 30. *Mandić AD, Woting A, Jaenicke T, Sander A, Sabrowski W, Rolle-Kampczyk U, von Bergen M, Blaut M* (2019) *Clostridium ramosum* regulates enterochromaffin cell development and serotonin release. *Sci Rep* 9: 1177.
<https://doi.org/10.1038/S41598-018-38018-Z>
 31. *Legan TB, Lavoie B, Mawe GM* (2022) Direct and indirect mechanisms by which the gut microbiota influence host serotonin systems. *Neurogastroenterology and motility* 34: e14346.
<https://doi.org/10.1111/NMO.14346>
 32. *Kelly JR, Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G, Hyland NP* (2015) Breaking down the barriers: The gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci* 9: 392.
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2015.00392/PDF>
 33. *Portincasa P, Bonfrate L, Khalil M, De Angelis M, Calabrese FM, D'amato M, Wang DQH, Di Ciaula A* (2021) Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD. *Biomedicine* 10: 83.
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10010083>
 34. *Wlodarska M, Luo C, Kolde R, d'Hennezel E, Annand JW, Heim CE, Krastel P, Schmitt EK, Omar AS, Creasey EA, Garner AL, Mohammadi S, O'Connell DJ, Abubucker S, Arthur TD, Franzosa EA, Huttenhower C, Murphy LO, Haiser HJ, Vlamakis H, Porter JA, Xavier RJ* (2017) Indoleacrylic Acid Produced by Commensal *Peptostreptococcus* Species Suppresses Inflammation. *Cell Host Microbe* 22: 25–37.e6.
<https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2017.06.007>
 35. *Flannigan KL, Nieves KM, Szczepanski HE, Serra A, Lee JW, Alston LA, Ramay H, Mani S, Hirota SA* (2023) The Pregnane X Receptor and Indole-3-Propionic Acid Shape the Intestinal Mesenchyme to Restrain Inflammation and Fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 15: 765–795.
<https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2022.10.014>
 36. *Ma X, Idle JR, Gonzalez FJ* (2008) The pregnane X receptor: from bench to bedside. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4: 895–908.
<https://doi.org/10.1517/17425255.4.7.895>
 37. *Barretto SA, Lasserre F, Huillet M, Régnier M, Polizzi A, Lippi Y, Fougerat A, Person E, Bruel S, Bétoulières C, Naylies C, Lukowicz C, Smati S, Guzylack L, Olier M, Théodorou V, Mselli-Lakhal L, Zalko D, Wahli W, Loiseau N, Gamet-Payraastre L, Guillou H, Ellero-Simatos S* (2021) The pregnane X receptor drives sexually dimorphic hepatic changes in lipid and xenobiotic metabolism in response to gut microbiota in mice. *Microbiome* 9: 93.
<https://doi.org/10.1186/S40168-021-01050-9>

LEVEL OF TRYPTOPHAN SIGNALING MOLECULES IN CHILDREN WITH DIFFERENT DYNAMICS OF OBESITY DEVELOPMENT

**O. P. Shatova^{a, b, #}, I. M. Kolesnikova^{a, c}, E. M. Yagodkina^a, S. S. Kaydoshko^a,
A. M. Gaponov^d, S. A. Roumiantsev^{a, c} and A. V. Shestopalov^{a, c}**

^a Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^b Peoples's Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

^c National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia

^d Research Center for Digital and Translational Biomedicine "Center for Molecular Health", Moscow, Russia

[#] e-mail: shatova.op@gmail.com

The high incidence of obesity in children is an extremely pressing problem in the modern health care system of many countries. There is an increase in the incidence of obesity in children in Russia, which is dangerous not only due to the development of somatic concomitant pathologies, but also to a violation of the social adaptation of children. Without a doubt, the search for early biochemical indicators of stabilization and progress of obesity in older age is very important for the formation of a risk group and timely prevention of the development of obesity and its complications. Our study showed that when assessing the various dynamics of obesity development, it is necessary to take into account the gender of the child, which is ignored in many cases. A decrease in serum serotonin concentrations may be considered as an indicator associated with the stabilization or progression of obesity in girls. Whereas in boys prone to stabilization and/or progression of obesity, a reduced serum level of indole-3-acrylate may act as a predictor marker.

Keywords: childhood obesity, tryptophan metabolism, predictors of obesity, serotonin, indole-3-acrylate

СРАВНИТЕЛЬНАЯ СКЕЛЕТОТОПИЯ ПОЯСНИЧНОГО ОТДЕЛА СПИННОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2024 г. П. Ю. Шкорбатова, В. А. Ляховецкий,
А. А. Вещицкий, Н. С. Меркульева *

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

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

Поступила в редакцию 11.04.2024 г.

После доработки 26.05.2024 г.

Принята к публикации 27.05.2024 г.

Спинальный мозг — наиболее филогенетически древнее образование центральной нервной системы. Более быстрый рост позвоночника по отношению к спинному мозгу в онтогенезе приводит к тому, что у взрослых млекопитающих некоторые сегменты спинного мозга смещены роstralно по отношению к одноименным позвонкам, что называют восхождением спинного мозга. На основе литературных данных проводили сравнение скелетотопии поясничного отдела спинного мозга 17-и видов млекопитающих. У 4-х видов также проводили сравнение скелетотопии новорожденных и взрослых животных. Определяли отношение длины сегмента L2 к длине позвонка VL2 и номер позвонка, в котором находится 29-й сегмент спинного мозга, характеризующие степень восхождения. На основе литературных данных определялись часто используемые в сравнительных исследованиях характеристики: ловкость пальцев и коэффициент энцефализации. Показано, что различные виды в большей степени отличаются между собой относительной длиной верхних поясничных сегментов, а в рамках одного вида новорожденные отличаются от взрослых особей относительной длиной нижних поясничных сегментов. Для большинства видов степень восхождения спинного мозга значимо положительно коррелирует с ловкостью пальцев и коэффициентом энцефализации. Рассмотренные макроанатомические характеристики спинного мозга могут быть использованы для анализа взаимосвязей адаптационных механизмов у различных видов млекопитающих.

Ключевые слова: спинной мозг, скелетотопия, восхождение, ловкость пальцев, энцефализация

DOI: 10.31857/S0044452924040032, **EDN:** YQNIOR

ВВЕДЕНИЕ

Спинальный мозг (СМ) млекопитающих — длинная цилиндрическая структура с, как правило, двумя утолщениями: шейным и поясничным. В СМ регулярно входят дорсальные корешки, сформированные аксонами клеток спинальных ганглиев, а выходят вентральные корешки, представляющие собой преимущественно аксоны мотонейронов [1]. СМ обычно разделяют на сегменты на основании положения зон входа дорсальных корешков (например, [2–8]). СМ млекопитающих занимает только часть позвоночного канала [9], что обусловлено его более медленным ростом по сравнению с позвоночником в пренатальный и ранний постнатальный периоды [10, 11]. Этот феномен, называемый восхождением СМ, наиболее выражен у сегментов поясничного и крестцового отделов, которые у взрослых животных располагаются выше, чем соответствующие им позвонки. Предполагается, что укорочение СМ является следствием того, что в онтогенезе сегменты шейного и поясничного утолщения СМ растут мед-

леннее одноименных позвонков [12–14], расширяясь и укорачиваясь по сравнению с другими сегментами СМ.

Степень восхождения СМ различна у разных видов млекопитающих. Например, у ежа крестцовый отдел СМ находится в шестом грудном позвонке [15], а у кошки — в пятом-шестом поясничных [4]. Вопрос о факторах, влияющих на степень восхождения, обсуждается в литературе достаточно давно [13, 14]. По-видимому, для его решения целесообразно, во-первых, однообразно описать некоторые параметры СМ, характеризующие восхождение, для как можно большего количества видов млекопитающих, в том числе и в онтогенезе [13, 14], и, во-вторых, предпринять поиск связи этих параметров с иными параметрами организма. Однако работы с количественным межвидовым анализом характеристик СМ крайне редки — в [14] рассматривается скелетотопия СМ ежа, кошки, кролика, свиньи и человека; в [16] — скелетотопия СМ крысы, кролика и морской свинки; в [8] — скелетото-

пия СМ кошки, кролика, свиньи, макаки-резуса и человека. Для сравнительно небольшого числа видов описана скелетотопия сегментов СМ.

Начиная с исследований Ч. Дарвина [17], количественные характеристики головного мозга, его отдельных структур и трактов используются в эволюционной биологии при изучении закономерностей филогенеза. Не менее популярен поиск корреляций между этими характеристиками и некоторыми параметрами животного, например, с массой тела [18], ловкостью пальцев [19], координацией движений [20], временем появления локомоции в онтогенезе [21] и т.д. СМ является важной частью нервной системы, однако поиску зависимостей с некоторыми характеристиками СМ уделено значительно меньшее внимание. В известных нам немногочисленных работах проводится анализ зависимостей площади утолщений СМ [22, 23], его длины [24] и количества нейронов в утолщениях [25] лишь от массы головного мозга, массы и длины тела животного.

Цель настоящей работы — провести метаанализ скелетотопии сегментов поясничного отдела СМ различных видов млекопитающих, полученной на основе литературных данных, предложить информативные параметры, описывающие степень восхождения, а также установить корреляционные зависимости этих параметров с коэффициентом энцефализации [18] и ловкостью пальцев [19] — характеристиками, часто используемыми в эволюционной биологии. Выбор поясничного отдела определяется, во-первых, важностью этого отдела для контроля локомоции, во-вторых, относительно большим набором данных именно по этому отделу, в-третьих, значительной выраженностью восхождения для сегментов этого отдела. Часть результатов работы была прежде представлена в тезисной форме [26].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таксономия видов, рассматриваемых в метаанализе, по [27] приведена на рис. 1. Скелетотопия взрослых животных была взята из следующих источников: европейский ёж (*Erinaceus europaeus*) — [15], европейский крот (*Talpa europaea*) — [28], крыса-пасюк (*Rattus norvegicus*) — [29], морская свинка (*Cavia porcellus*) — [16], домашняя собака (*Canis lupus familiaris*) и дикий кролик (*Oryctolagus cuniculus*) — [30], домашняя кошка (*Felis catus*) — [6], европейская норка (*Mustela lutreola*) и песец (*Vulpes lagopus*) — [31], каспийская нерпа (*Pusa caspica*) — [32], домашняя свинья (*Sus domesticus*) — [33], домашний осёл (*Equus asinus asinus*) — [2], домашний бык (*Bos taurus*) — [34], двупалый ленивец (*Choloepus hoffmanni*) — [35, 36], виргинский опоссум (*Didelphis virginiana*) — [37], макак-резус (*Macaca mulatta*) — [38], человек

разумный (*Homo sapiens sapiens*) — [39, 40]. Скелетотопия новорождённых животных была взята из следующих источников: домашняя кошка (*Felis catus*) — [7], европейская норка (*Mustela lutreola*) и песец (*Vulpes lagopus*) — [31], человек разумный (*Homo sapiens sapiens*) — [41].

Для оценки степени восхождения нами предложено два параметра. Во-первых, номер позвонка (*vertebra*, V), в котором оканчивается 29-й сегмент СМ (наиболее каудальный сегмент, информация о котором была доступна нам из данных литературы для всех анализируемых видов животных). Например, для человека при позвоночной формуле VC7 (шейный, *cervical*, C) VT12 (грудной, *thoracic*, T) VL5 (поясничный, *lumbar*, L) VS5 (крестцовый, *sacral*, S) — это сегмент S4 (напомним, что в семи шейных позвонках млекопитающих находятся восемь сегментов), который находится в позвонке VL1 — 20-м, считая от первого шейного позвонка [39]. Во-вторых, относительная длина сегмента. Предполагается, что степень восхождения СМ в основном обусловлена относительной длиной нижних грудных и верхних поясничных позвонков [13], поэтому необходимо нормирование длины спинальных сегментов. Существуют различные способы этого нормирования. Нормировка к общей длине СМ [12] неудачна для сравнения видов с различной позвоночной формулой, нормировка к длине одноименного позвонка [11] затруднительна для крестцовых сегментов. Как следствие, для описания степени восхождения мы, аналогично [6, 7, 33], использовали отношение длины второго поясничного сегмента к длине одноименного позвонка (L2/VL2).

Коэффициент энцефализации (КЭ) рассчитывался по формуле: $КЭ = m / (0.12 \cdot M^{2/3})$, где m — масса мозга, г, а M — масса тела, г. КЭ для норки рассчитывался на основе данных [42], для крысы — [43], для прочих видов — [18]. Степень ловкости пальцев определяли по ранговой шкале, основанной преимущественно на анатомии передних конечностей. Наименьший ранг, 1, присвоен животным, передние конечности которых имеют крайне ограниченные возможности манипулирования объектами за счет слияния и редукции пальцев (например, осёл). Наибольший ранг, 7, присвоен животным (человеку) с противостоящим большим пальцем, способным к точному хвату [19]. Степень ловкости пальцев крысы была взята из [44], кошки — из [45], прочих видов — из [19].

В рамках анализа корреляционных зависимостей выделяли высокоспециализированные виды животных, под которыми в контексте данной работы понимаются виды, обладающие некоторыми особыми локомоторными или поструральными способностями, отличными от обычной локомоции и



поддержания равновесия, например, существенная модификация конечностей и тела для плавания (тюлень), особенности строения позвоночника [46] для возможности сворачивания (ёж), модификация передних конечностей для рытья подземных ходов (крот). Значимость корреляций Пирсона и Спирмена определялась на уровне 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительная скелетотопия поясничного-крестцового отдела СМ взрослых животных приведена на рис. 2а. У ежа и тюленя — наибольшая степень восхождения (29-й сегмент СМ расположен в 13-м и 16-м позвонках соответственно), а у осла — наименьшая (29-й сегмент СМ расположен в 28-м позвонке). У видов с относительно низкой степенью восхождения некоторые сегменты поясничного отдела СМ нисходят: например, сегменты L1 и L2 у кошки, кролика, морской свинки, быка, свиньи и осла расположены несколько ниже, чем одноименные позвонки.

На рис. 2б приведена относительная длина поясничных сегментов СМ рассматриваемых видов, приведенная к длине VL2. Данные сгруппированы в соответствии с числом поясничных сегментов (3, 5, 6 или 7). Из рис. 2а, б видно, что у большинства видов относительная длина верхних поясничных сегментов больше, чем длина нижних поясничных. Исключениями являются ёж (примерно равная длина всех поясничных сегментов) и ленивец (длина верхних поясничных сегментов больше, чем у нижних поясничных).

Наибольшие межвидовые отличия по относительной длине показаны для верхних, но не нижних поясничных сегментов СМ (рис. 2). Например, для осла и человека, видов, имеющих пять поясничных сегментов, относительная длина верхнего поясничного сегмента L1 составляет 1.03 и 0.45, соответственно, в то время как относительная длина нижнего поясничного сегмента L5 — 0.42 и 0.23, соответственно. Аналогично, для песца и резуса, видов, имеющих семь поясничных сегментов, относительная длина верхнего поясничного сегмента L1 песца составляет 1.23 и 0.74, соответственно, в то время как относительная длина нижнего поясничного сегмента L7 — 0.31 и 0.42, соответственно.

Сравнительная скелетотопия новорожденных и взрослых животных приведена на рис. 3а. У человека и кошки восхождение, по-видимому, в значительной степени завершено пренатально: у новорожденных детей 29-й сегмент (S4) уже находится в позвонке VL1, у котят 29-й сегмент (S1) уже находится в позвонке VL5. Между тем, у норки и песца 29-й сегмент (S1) восходит от границы между позвонками VL6—VS1 до границы между позвонками

VL4—VL5 и от позвонка VL7 до позвонка VL5 соответственно. У кошки постнатально нисходят все поясничные сегменты (L1—L7), у человека наблюдается незначительное нисхождение сегментов L1 и L2. Из рис. 3б видно, что новорожденные животные в большей степени отличаются от взрослых по относительной длине нижних поясничных, но не верхних поясничных сегментов СМ.

Выбранные нами параметры, характеризующие восхождение СМ: отношение длины второго поясничного сегмента к длине одноименного позвонка (L2/VL2) и номера позвонка, содержащего 29-й сегмент СМ, значительно коррелируют между собой ($R_{\text{Пирсон}} = 0.86, p < 0.001$). На рис. 4 приведены зависимости этих параметров от степени ловкости пальцев и КЭ. Небольшая выборка высокоспециализированных видов не позволяет найти нам коэффициенты корреляции между выбранными парами параметров для этой группы. Однако имеющиеся данные позволяют предположить, что степень восхождения СМ таких видов не зависит ни от ловкости пальцев, ни от КЭ. Для не высокоспециализированных (прочих) видов чем больше восходит СМ, тем большие значения принимают ловкость пальцев и КЭ. Оба выбранных нами параметра достоверно связаны с ловкостью пальцев ($R_{\text{Спирмен}} = -0.61, p < 0.05$ и $R_{\text{Спирмен}} = -0.90, p < 0.001$, соответственно), также выявлена достоверная связь номера позвонка, содержащего 29-й сегмент СМ, и КЭ ($R_{\text{Пирсон}} = -0.68, p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Какая степень детализации необходима при изучении восхождения СМ? Согласно некоторым авторам, СМ невозможно строго разделить на субъединицы, поскольку отсутствуют маркеры, позволяющие однозначно выделить в сером веществе дискретные области с четкими границами [47, 48]. Другие авторы предполагают возможность регионального деления, например, на предплечевой, плечевой, постплечевой, бедренный, постбедренный и каудальный регионы, что коррелирует с паттерном экспрессии гомеозисных (HOX) генов в процессе онтогенеза [49, 50]. Однако с помощью этих подходов, по-видимому, крайне затруднительно описать возрастную динамику изменений ряда макроанатомических параметров СМ. Например, скорость роста сегментов одного региона (см. рис. 3 данной работы; [7, 11, 13]) может значительно различаться. Структурно-функциональная организация СМ подразумевает возможность его деления на более мелкие, чем регионы, единицы. Мотонейронные пулы, управляющие различными группами мышц, строго упорядочены вдоль rostroкаудальной оси спинного мозга [3, 51]. Это отражает эмбриональную организацию периодических связей между сомитами и нервной трубкой за счет мигра-

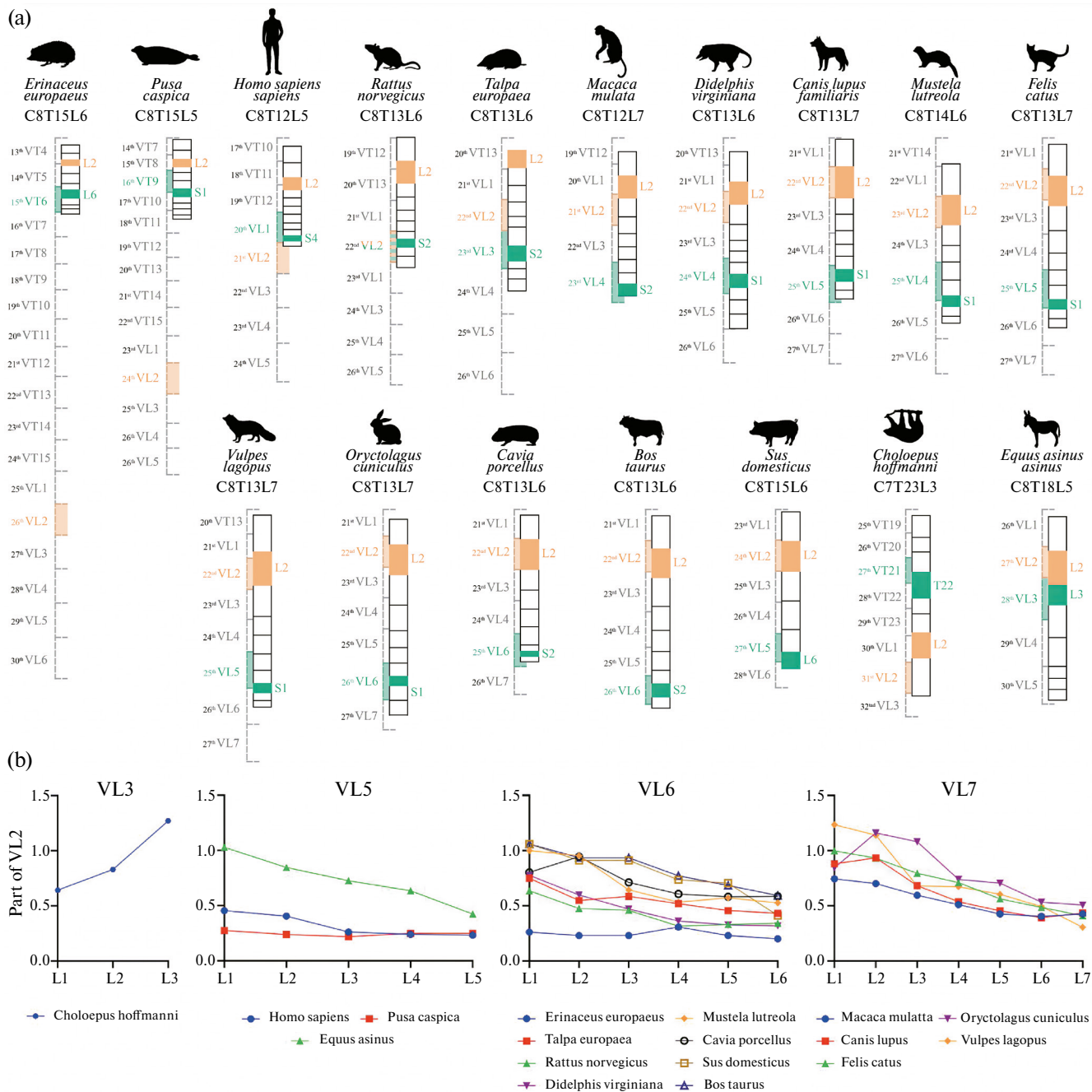


Рис. 2. Скелетотопия (а) и относительная длина (б) сегментов поясничного отдела спинного мозга взрослых животных для видов, использованных в метаанализе. На (а) для каждого вида указано число шейных, грудных и поясничных сегментов; слева пунктиром обозначены позвонки с нумерацией их по отделам (VT4–VL7) и непрерывной нумерацией, начиная от первого шейного позвонка (13th–32nd); светло-зелёным обозначен позвонок, в котором находится 29-й сегмент спинного мозга. Масштаб выбран так, чтобы длина позвонка VL2 (обозначен светло-оранжевым), используемого для нормировки, была одинаковой для всех видов. Черными прямоугольниками обозначены сегменты спинного мозга, сегмент L2 обозначен ярко-оранжевым, а 29-й сегмент – ярко-зелёным. Виды животных упорядочены по степени восхождения 29-го сегмента спинного мозга. На (б): Отношение длин поясничных сегментов к длине позвонка VL2. На каждом графике представлены виды животных с равным количеством поясничных позвонков (VL3, VL5–VL7). L – поясничный сегмент, part of VL2 – доля от длины позвонка VL2.

ции клеток нервного гребня [52]. Аfferентные входы в систему дорсальных корешков, организуемые нейронами спинальных ганглиев, также имеют топическую привязку.

Деление СМ на сегменты на основании входных зон дорсальных корешков также имеет значение в ряде практических задач, например, при выборе зоны электрической стимуляции СМ в медицин-

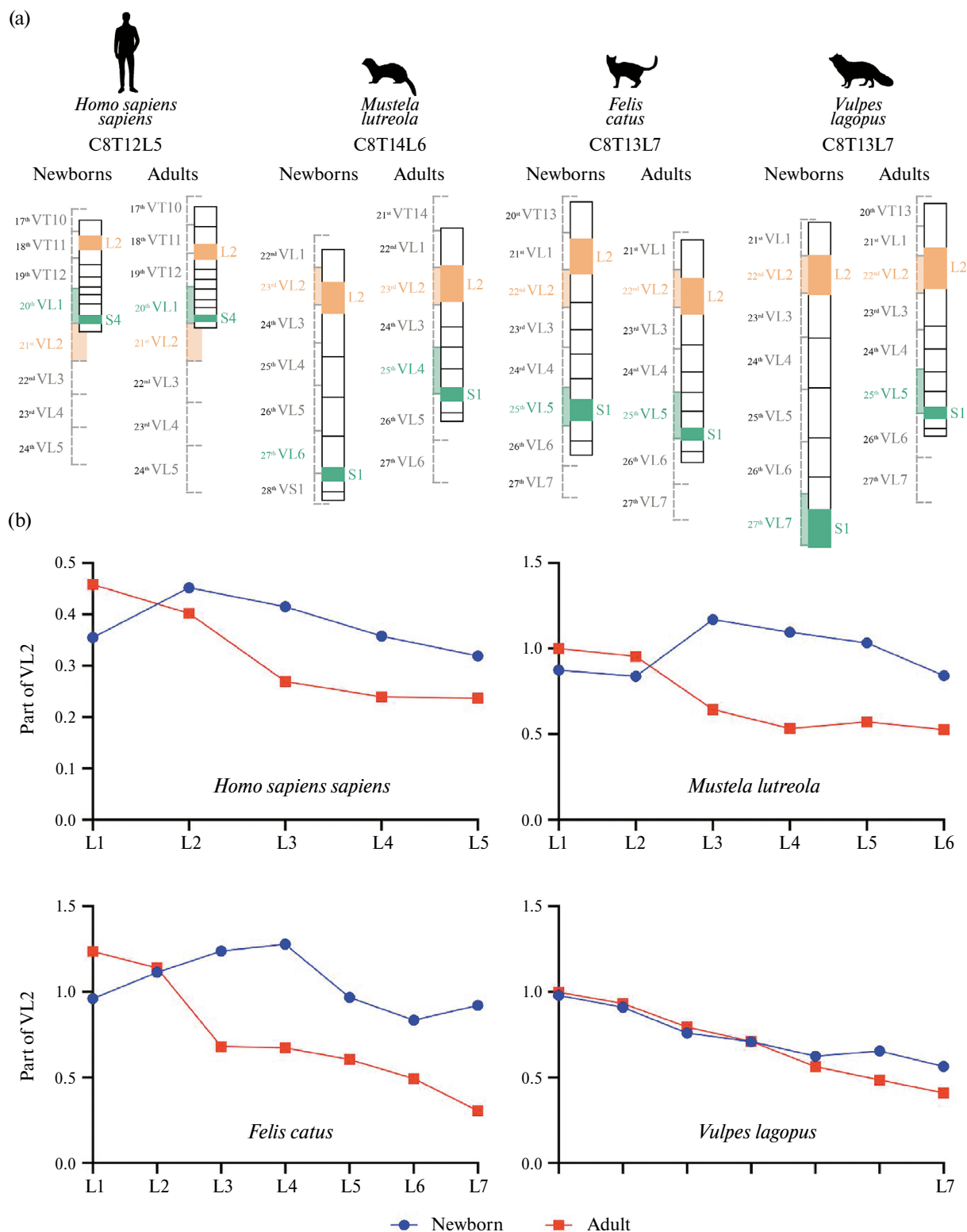


Рис. 3. Скелетотопия (a) и относительная длина (b) сегментов поясничного отдела спинного мозга новорожденных (newborn) и взрослых (adult) животных. На (a) для каждого вида указано число шейных, грудных и поясничных сегментов; слева пунктиром обозначены позвонки с нумерацией их по отделам и непрерывной нумерацией, начиная от первого шейного; светло-зелёным обозначен позвонок, в котором находится 29-й сегмент спинного мозга. Масштаб выбран так, чтобы длина позвонка VL2 (обозначен светло-оранжевым), используемого для нормировки, была одинаковой для всех видов. Черными прямоугольниками обозначены сегменты спинного мозга, сегмент L2 обозначен ярко-оранжевым, а 29-й сегмент — ярко-зелёным. На (b): отношение длин поясничных сегментов к длине позвонка VL2 у новорожденных и взрослых животных. L — поясничный сегмент, part of VL2 — доля от длины позвонка VL2.

ской практике [40, 53], диагностике травмы СМ или планировании хирургического вмешательства [5, 54]. Локальные воздействия на СМ в разных возрастных группах следует проводить с учетом неоднородности возрастных изменений размеров и положения его сегментов, поэтому большее внимание уделяется скелетотопии лабораторных животных (кошка, крыса, свинья, макак-резус) и человека [8].

Известно, что восхождение СМ происходит неравномерно в процессе онтогенеза, затем некоторые сегменты могут нисходить (кошка [4, 7], свинья [13, 55], ленивец [36], крыса [56], импала [57]; рис. 2а, 3а). Тем не менее, этот сложный процесс в большинстве литературных источников оценивается посредством единственного, относительно простого параметра — положения *conus medullaris* (человек [58–60], овца [61], верблюд [62], северный морской котик, сивуч, калан, пёстрая нерпа, тюлень Стейнегера, морская свинья Далля [63]). В ряде работ проводится анализ размеров отделов или подотделов СМ (макак-резус [64], мышь [10], крыса [56], кошка [4, 65], песец и норка [31], кролик [66], собака [67], коза [68]). Лишь в работах на овце [11] и кошке [7] проведен посегментный анализ роста СМ.

Из рис. 2б видно, что степень восхождения СМ у различных видов в большей степени обусловлена размером верхних поясничных, а не нижних поясничных сегментов; об этом же феномене свидетельствует значимая корреляция отношения L2/VL2 с номером позвонка, содержащим 29-й сегмент СМ: чем больше восходит СМ, тем короче верхние поясничные сегменты. По-видимому, это связано с тем, что длинные сегменты СМ никогда не имеют большую ширину и площадь. Нижние поясничные сегменты, являющиеся частью поясничного утолщения, должны обладать большой шириной и площадью, и, следовательно, будут укорочены у всех видов.

Как правило, предполагается, что поясничный и крестцовый отдел СМ восходят не только в пренатальный, но и в постнатальный период [58, 69, 70]. Например, крестцовый отдел СМ норки восходит с VS1 (новорождённые) до VL5 (180 дней), крестцовый отдел СМ песца восходит с VL7 (новорождённые) до VL5 (180 дней) (рис. 3а; [31]), *conus medullaris* у мыши восходит с VS5 (новорождённые) до VL5 (120 дней) [10], у верблюда — с середины VS3 (новорождённые) до ростральной части VS2 (7–10 лет) [62], у овцы — с VS3 (новорождённые) до VS2 (взрослые) [11], у сивуча — с VT8–VT9 (щенки) до VT5 (взрослые самки) или VT4 (взрослые самцы) [63], у ларги и курильского тюленя — с VT12–VT13 (щенки) до VT9–VT12 (взрослые особи) [63]. Между тем, согласно ряду литературных данных, для некоторых видов восхождение СМ заканчивается пренатально. Например, диапазон изменчивости по-

ложения нижней границы поясничного отдела СМ у новорожденных и взрослых людей крайне сходен ([39]; рис. 3а), положение крестцового отдела СМ новорожденных котят такое же, как у взрослых животных (рис. 3а; [7]), взрослый уровень подъема СМ (VL4) наблюдался у недельных макак-резусов [64], у щенков (до 6 месяцев) СМ заканчивается выше (VL5), чем у взрослых собак (VL6) [71].

Об эволюционных аспектах роста позвонков известно крайне мало [72]. На ранней стадии эволюции млекопитающих число грудных и поясничных позвонков было диверсифицировано за счет ослабления функциональных ограничений НОХ-генов у эутериев (*Hoxa11*, *Hoxd9*) и лавразиатериев (*Hoxc10*) [73]. Эволюционная изменчивость скорости роста позвонков у разных видов может обеспечивать гетерохронный механизм возникновения различий в грудопоясничном отделе позвоночника, связанных с типом локомоции [72]. При этом ограничения вариативности позвоночной формулы в грудопоясничном отделе могут быть обусловлены биомеханикой локомоции: предположительно, у более быстрых млекопитающих позвоночная формула менее вариативна [74].

Данные по пренатальному сегментарному развитию СМ скудны, однако позволяют предположить общность онтогенетических механизмов развития СМ в различных таксонах млекопитающих [11, 13, 75]. В частности, на ранних стадиях эмбрионального развития длины миотомов и сегментов СМ соответствует друг другу [11, 13], причем у эмбрионов свиньи и человека наиболее длинными являются сегменты шейного и поясничного утолщений [13]. Далее происходит относительное укорочение сегментов шейного утолщения (овца [11], свинья, человек [13]), затем — относительное удлинение нижних грудных и верхних поясничных сегментов и относительное укорочение нижних поясничных сегментов (свинья, человек [13], коза [75]). Новорождённые животные отличаются от зрелых животных того же вида лишь относительной длиной нижних поясничных сегментов. Такое отличие наблюдается не только для незрелорождающихся видов, представленных на рис. 3, но и для зрелорождающейся овцы [76]. Предположительно, постнатальная скорость роста верхних поясничных сегментов равна или даже превышает скорость роста одноименных позвонков, что приводит как к нисхождению некоторых сегментов (рис. 3), так и к дальнейшему относительному укорочению нижних поясничных сегментов, необходимому для формирования функционального поясничного утолщения.

Ряд адаптационных факторов влияет на степень восхождения СМ у высокоспециализированных видов. СМ, заканчивающийся в грудном позво-

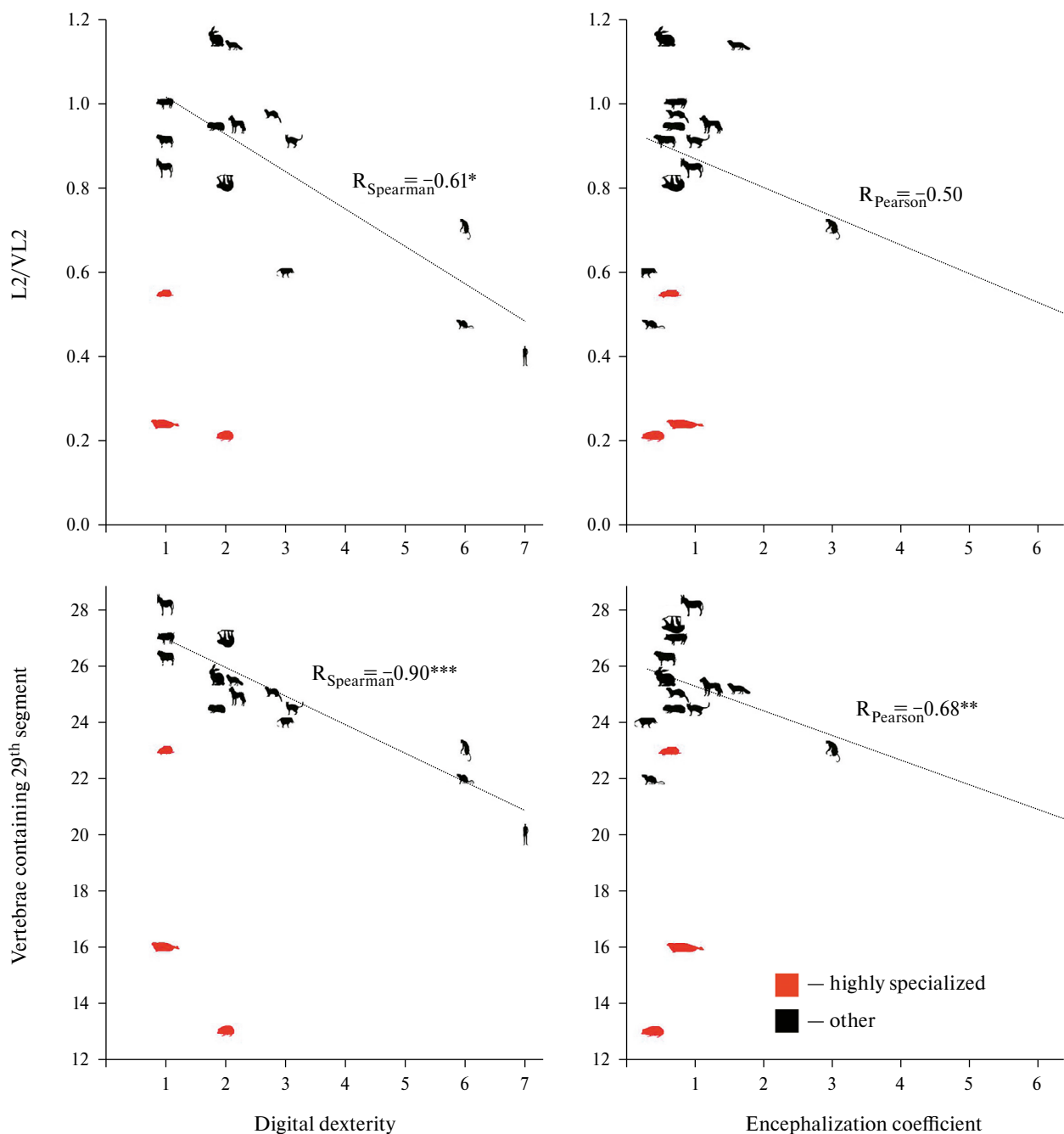


Рис. 4. Связь параметров восхождения (относительной длины сегмента L2 (L2/VL2) и номера позвонка, содержащего 29-й сегмент спинного мозга, (vertebrae containing 29th segment)) с ловкостью пальцев (digital dexterity) и коэффициентом энцефализации (encephalization coefficient). Highly specialized – высокоспециализированные, other – не высокоспециализированные (прочие) виды. R_{Spearman} , R_{Pearson} – значения коэффициента корреляции Спирмена и Пирсона, соответственно. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

ночном отделе у ехидны [77], панголина [78] и ежа ([15]; рис. 2а), позволяет им сворачиваться, занимая оборонительную позицию [79]. Значительная степень восхождения СМ крота может быть обусловлена высокой специализацией его передних конечностей (рис. 2а). Утрата задних конечностей у китообразных [80, 81], водная специализация ко-

нечностей у ластоногих ([63, 82]; рис. 2а) и слабое развитие задних конечностей летучих мышей [83, 84] также приводят к развитию короткого СМ. Интересно отметить, что помимо млекопитающих относительно коротким СМ обладают бесхвостые амфибии [9] и некоторые виды иглобрюхообразных рыб (*Tetraodontiform*) [85]. Причем для обеих групп

животных такое укорочение предположительно может быть связано с редукцией, упрощением или полной потерей элементов скелета, особенно в его каудальной части [85, 86]. Напротив, длинный цепкий хвост у обезьян приводит к развитию относительно длинного СМ [87, 88].

Вероятно, НОХ-гены, контролирующие паттерн развития скелета, косвенно регулируют степень восхождения СМ. СМ мышцей, мутантных по гену *Hoxb13*, которые обладают более длинным хвостом по сравнению с диким типом, длиннее, чем у мышцей дикого типа, как за счет появления дополнительных копчиковых сегментов, так и за счет удлинения более роstralных сегментов [89]. У гомозиготных мышцей, нокаутных по генам *Hoxa10* и *Hoxd10*, по сравнению с мышцами дикого типа не только появляется дополнительное ребро (VT14), но и на 2-3 позвонка опускаются моторные колонки поясничного отдела [90]. У гомозиготных мышцей, одновременно нокаутных по генам *Hoxc10* и *Hoxd10*, по сравнению с мышцами дикого типа роstralная граница моторных колонок поясничного отдела смещается каудально, как следствие, у таких мышцей моторные колонки поясничного отдела занимают три, а не пять сегментов, как у животных дикого типа [91].

Полученные нами корреляционные зависимости (рис. 4) показывают, что для не высокоспециализированных видов степень восхождения СМ положительно связана с КЭ и степенью ловкости пальцев. Причем корреляции со степенью ловкости пальцев выше для обоих параметров, используемых нами для описания степени восхождения. Процессы изменения функций конечностей, преимущественно автоподия, в различных таксонах млекопитающих происходят, как сказано в статье [92], “относительно легко” за счет дифференциальной регуляции одного и того же набора генов. В результате, насколько позволяет судить наша ограниченная выборка, полученные корреляционные зависимости слабо связаны с принадлежностью вида некоторому определенному таксону. Вслед за [13] можно предполагать, что у видов, обладающих высокой ловкостью пальцев и значительно дифференцированными двигательными и чувствительными функциями передних конечностей, формирование функциональных нейрональных связей шейного утолщения задерживает процесс удлинения нижних грудных и верхних поясничных сегментов. Данные ретроградного трейсирования мотонейронов, доступные для некоторых видов из нашей выборки, указывают на то, что укорочение СМ сопровождается более роstralным положением мотонейронных пулов задних конечностей в рамках поясничного утолщения (например, мотонейроны сгибателя бедра расположены в сегментах L1/L2–L2/L3

(*m. iliopsoas*) у макаки-резуса [93], в сегментах L1–L3 (*m. psoas minor*) у крысы [94], но в сегментах L4–L5 (*m. iliopsoas*) у кошки [3]; мотонейроны разгибателя бедра (*m. semimebranosus*) расположены в сегментах L3–L5 у макаки-резуса [93], в сегментах L3–L4 у крысы [95], но в сегментах L6–L7 у кошки [3]). Это позволяет предположить, что вышеобозначенные процессы (укорочение нижних грудных и верхних поясничных сегментов и роstralное смещение мотонейронных пулов) являются возможными эволюционными механизмами, способствующими облегчению кортикального контроля над спинальными моторными сетями. В пользу данного предположения косвенно свидетельствуют данные о нарушениях развития кортикоспинального тракта у мышцей, нокаутных по гену эфринового рецептора 4 типа (*EphA4*), у которых проекции кортикоспинального тракта в поясничном утолщении выражены в меньшей степени, чем в контроле [96], что сопровождается более каудальным положением мотонейронных пулов разгибателя голени (*m. tibialis anterior*) [97].

Таким образом, впервые проведено сравнение скелетотопии сегментов СМ относительно позвонков у 17-и видов млекопитающих, принадлежащих к различным таксонам. Предложены информативные параметры, описывающие степень восхождения СМ: отношение длины второго поясничного сегмента к длине одноименного позвонка, а также номер позвонка, в котором расположен 29-й сегмент. Полученные данные указывают, что на степень восхождения СМ оказывают влияние различные адаптационные факторы. Степень восхождения СМ у не высокоспециализированных видов положительно коррелирует с КЭ и ловкостью пальцев передних конечностей.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (П.Ю.Ш., В.А.Л.), сбор данных (П.Ю.Ш., В.А.Л., Н.С.М., А.А.В.), обработка данных (П.Ю.Ш., В.А.Л.), написание и редактирование манускрипта (П.Ю.Ш., В.А.Л., Н.С.М., А.А.В.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kayalioglu G* (2009) "The spinal nerves" in The spinal cord, eds C. Watson, G. Paxinos, and G. Kayalioglu (Amsterdam: Elsevier), 238–306.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50019-5>
2. *Haziroğlu RM, Öcal MK* (1988) Comparative morphological studies on the spinal cord of the donkey. II. The topography of the segments. *A U Vet Fak Derg* 35: 476–487.
3. *Vanderhorst VG, Holstege G* (1997) Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *J Comp Neurol* 382: 46–76.
4. *Maierl J, Liebich HG* (1998) Investigations on the postnatal development of the macroscopic proportions and the topographic anatomy of the feline spinal cord. *Anatomia Histologia Embryologia* 27: 375–379.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1998.tb00210.x>
5. *Canbay S, Güner B, Bozkurt M, Comert A, İzci Y, Başkaya MK* (2014) Anatomical relationship and positions of the lumbar and sacral segments of the spinal cord according to the vertebral bodies and the spinal roots. *Clin Anat* 27: 227–233.
<https://doi.org/10.1002/ca.22253>
6. *Shkorbatova PY, Lyakhovetskii VA, Merkulyeva NS, Veshchitskii AA, Bazhenova EY, Laurens J, Pavlova NV, Musienko PE* (2019) Prediction algorithm of the cat spinal segments lengths and positions in relation to the vertebrae. *Anat Rec (Hoboken)*. 302: 1628–1637.
<https://doi.org/10.1002/ar.24054>
7. *Shkorbatova PY, Lyakhovetskii VA, Veshchitskii AA, Bazhenova EY, Pavlova NV, Musienko PE, Merkulyeva NS* (2023) Postnatal growth of the lumbosacral spinal segments in cat: Their lengths and positions in relation to vertebrae. *Anat Rec (Hoboken)* 306: 831–843.
<https://doi.org/10.1002/ar.24945>
8. *Toossi A, Bergin B, Marefatallah M, Parhizi B, Tyreman N, Everaert DG, Rezaei S, Seres P, Gatenby JC, Perlmutter SI, Mushahwar VK* (2021) Comparative neuroanatomy of the lumbosacral spinal cord of the rat, cat, pig, monkey, and human. *Sci Rep* 11: 1955.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-81371-9>
9. *Nieuwenhuys R* (1964) Comparative anatomy of the spinal cord. In *JC Eccles JP Schädé* (Eds.), *Progress in brain research*: 1–57. Elsevier.
10. *Sakla FB* (1969) Quantitative studies on the postnatal growth of the spinal cord and the vertebral column of the albino mouse. *J Comp Neurol* 136: 237–251.
<https://doi.org/10.1002/cne.901360209>
11. *Ghazi SR, Gholami S* (1994) Allometric growth of the spinal cord in relation to the vertebral column during prenatal and postnatal life in the sheep (*Ovis aries*). *J Anat* 185: 427–431.
12. *Lüderitz C* (1881) Über das rückenmarkssegment. Ein beiträg zur morphologie und histologie des rückenmarks. *Archiv Anat Physiol* 8: 423–495.
13. *Лебедкин СИ* (1936) Изменение длины спинного мозга и осевого скелета в течение развития у человека и у свиньи. Изв научного ин-та им ПФ Лесгафта XX: 13–94. [*Lebedkin SI* (1936) Changes in the length of the spinal cord and axial skeleton during development in humans and pigs. *Izv nauchnogo in-ta im PF Lesgafta*. XX: 13–94. (In Russ).].
14. *Лебедкин СИ* (1937) Спинной мозг ежа и некоторых млекопитающих. К вопросу об образовании конского хвоста / Сборник, посвященный памяти М.А. Мензибра. М.-Л.: 261–290. [*Lebedkin SI* (1937) Spinal cord of the hedgehog and some mammals. On the issue of the formation of the cauda equina / *Sbornik, posvyashchenny pamyati M.A. Menzibra*. М.-Л.: 261–290. (In Russ).].
15. *Malinska J, Kapoun S, Malinsky J* (1972) Topography of the spinal cord in the East Central European hedgehog (*Erinaceus roumanicus centroeuropaeus*). *Folia Morphologica* 10: 182–184.
16. *Козельская ЛА* (1980) Топография сегментов и ядер спинного мозга у лабораторных животных (Морфологическое исследование). Дисс. на соиск. степ. к.б.н. Смоленск — Чита. 279 с. [*Kozelskaya LA* (1980) Topography of segments and nuclei of the spinal cord in laboratory animals (Morphological study). PhD Thesis. Smolensk — Chita. 279 p. (In Russ).].
17. *Darwin CR* (1871) The Descent of man, and selection in relation to sex (Vol. 1). John Murray, Albemarle Street, London, UK.
18. *Boddy AM, McGowen MR, Sherwood CC, Grossman LI, Goodman M, Wildman DE* (2012) Comparative analysis of encephalization in mammals reveals relaxed constraints on anthropoid primate and cetacean brain scaling. *J Evol Biol* 25: 981–994.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02491.x>
19. *Heffner R, Masterton B* (1975) Variation in form of the pyramidal tract and its relationship to digital dexterity. *Brain Behav Evol* 12: 161–200.
<https://doi.org/10.1159/000124401>
20. *Nudo RJ, Masterton RB* (1990) Descending pathways to the spinal cord, IV: Some factors related to the amount of cortex devoted to the corticospinal tract. *J Comp Neurol*. 296: 584–597.
<https://doi.org/10.1002/cne.902960406>
21. *Garwicz M, Christensson M, Psouni E* (2009) A unifying model for timing of walking onset in humans and other mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21889–21893.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0905777106>

22. MacLarnon A (1995) The distribution of spinal cord tissues and locomotor adaptation in primates. *J Hum Evol* 29: 463–482.
<https://doi.org/10.1006/jhev.1995.1069>
23. Ashwell KW, Shulruf B (2014) Spinal cord development in marsupials in relation to birthing strategies and in comparison, with monotremes and the laboratory rat. *Somatosens Mot Res* 31: 152–165.
<https://doi.org/10.3109/08990220.2014.907150>
24. MacLarnon A (1996) The scaling of gross dimensions of the spinal cord in primates and other species. *J Hum Evol* 30: 71–87.
<https://doi.org/10.1006/jhev.1996.0005>
25. Burish MJ, Peebles JK, Baldwin MK, Tavares L, Kaas JH, Herculano-Houzel S (2010) Cellular scaling rules for primate spinal cords. *Brain Behav Evol* 76: 45–59.
<https://doi.org/10.1159/000319019>
26. Шкорбатова ПЮ, Ляховецкий ВА, Вещицкий АА, Меркульева НС (2020) Эволюционные аспекты восхождения спинного мозга млекопитающих. *Журн эвол физиол биохим* 56: 719. [Shkorbatova PYu, Lyakhovetskii VA, Veshchitskii AA, Merkulyeva NS (2020) Evolutionary aspects of the ascension of the spinal cord in mammals. *J Evol Fiziol Biokhim* 56: 719. (In Russ)].
27. Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*.
<https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
28. Malinska J, Hubackova E, Malinsky J (1976) A topographical and quantitative anatomical study of the spinal cord in the mole. *Acta University Palacky Olomus Faculty Med.* 76: 169–178.
29. Gilerovich EG, Moshonkina TR, Fedorova EA, Shishko TT, Pavlova NV, Gerasimenko YP, Otellin VA (2008) Morphofunctional characteristics of the lumbar enlargement of the spinal cord in rats. *Neurosci Behav Physiol* 38: 855–860.
<https://doi.org/10.1007/s11055-008-9056-8>
30. Бурдей ГД (1960) Морфология и скелетотопия элементов спинного мозга некоторых экспериментальных животных. *Труды Саратов мед ин-та XXXI*: 289–317. [Burdey GD (1960) Morphology and skeletopy of elements of the spinal cord of some experimental animals. *Trudy Sarat med in-ta XXXI*: 289–317. (In Russ)].
31. Илюшина ИА (2002) Возрастная морфология и скелетотопия спинного мозга и его твердой оболочки у норки и песца клеточного содержания в раннем постнатальном онтогенезе. Дисс. на соиск. степ. к.б.н. М. 177 с. [Ilyushina IA (2002) Age-related morphology and skeletotopy of the spinal cord and its dura mater in mink and arctic fox cage content in early postnatal ontogenesis. PhD Thesis. M. 177 p. (In Russ)].
32. Щербакова АА (1962) К морфологии и скелетотопии корешков спинномозговых нервов у тюленя. *Труды Ростовского мед ин-та* 17: 63–73. [Shcherbakova AA (1962) K morfologii i skeletotopii koreshkov spinnomozgovykh nervov u tyuleny [On the morphology and skeletotopy of the spinal nerve roots in the seal]. *Trudy Rostovskogo med in-ta* 17: 63–73 (In Russ)].
33. Cuellar CA, Mendez AA, Islam R, Calvert JS, Grahn PJ, Knudsen B, Pham T, Lee KH, Lavrov IA (2017) The role of functional neuroanatomy of the lumbar spinal cord in effect of epidural stimulation. *Frontiers in Neuroanatomy*. 11: 82.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00082>
34. Sisson S, Grossman JD, Getty R (1975) Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals. V. 1. Philadelphia: Saunders, 1975.
35. Goffart M, Gerebtzoff MA (1965) Spinal roots in the sloth. *Nature*. 206: 1062–1063.
<https://doi.org/10.1038/2061062a0>
36. Goffart M, Gerebtzoff MA, Duchesne PY (1967) The spinal roots in the sloth (*Choloepus hoffmanni* Peters). *J Comp Neurol*. 131: 393–403.
<https://doi.org/10.1002/cne.901310309>
37. Voris HC (1928) The morphology of the spinal cord of the virginian opossum (*Didelphis virginiana*). *J Comp Neurol*. 46: 407–459.
<https://doi.org/10.1002/cne.900460203>
38. Capogrosso M, Milekovic T, Borton D, Wagner F, Moraud EM, Mignardot JB, Buse N, Gandar J, Barraud Q, Xing D, Rey E, Duis S, Jianzhong Y, Ko WK, Li Q, Detemple P, Denison T, Micera S, Bezard E, Bloch J, Courtine G (2016) A brain-spine interface alleviating gait deficits after spinal cord injury in primates. *Nature* 539: 284–288.
<https://doi.org/10.1038/nature20118>
39. Бурдей ГД (1984) Спинной мозг. Саратов: СГУ. 263 с. [Burdey GD (1984) Spinal cord. Saratov: SGU. 263 p. (In Russ)].
40. Mendez A, Islam R, Latypov T, Basa P, Joseph OJ, Knudsen B, Siddiqui AM, Summer P, Staehnke LJ, Grahn PJ, Lachman N, Windebank AJ, Lavrov IA (2021) Segment-specific orientation of the dorsal and ventral roots for precise therapeutic targeting of human spinal cord. *Mayo Clin Proc* 96: 1426–1437.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.07.039>
41. Бурдей ГД (1960) Топографоанатомические особенности сегментов спинного мозга новорожденных и у детей первого года жизни. *Труды Саратов мед ин-та XXXI*: 276–289. [Burdey GD (1960) Topographic-anatomical features of the spinal cord segments of newborns and children of the first year of life. *Trudy Sarat med in-ta XXXI*: 276–289 (in Russ)].
42. Gittleman JL (1986) Carnivore brain size, behavioral ecology, and phylogeny. *J Mammalogy* 67: 23–36.
<https://doi.org/10.2307/1380998>
43. Roth G, Dicke U (2005) Evolution of the brain and intelligence. *Trends Cognitive Sci* 9: 250–257.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2005.03.005>
44. Iwaniuk AN, Pellis SM, Whishaw IQ (1999) Is digital dexterity really related to corticospinal projections?: a re-analysis of the Heffner and Masterton data set using modern comparative statistics. *Behav Brain Res* 101: 173–187.
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00151-X)
45. Lemon RN, Griffiths J (2005) Comparing the function of the corticospinal system in different species: organization-

- al differences for motor specialization? *Muscle & Nerve*. 32: 261–279.
<https://doi.org/10.1002/mus.20333>
46. Gupta BB (1961) Investigations of the rolling mechanism in the indian hedgehog. *J Mammal* 42: 365–371.
<https://doi.org/10.2307/1377033>
 47. Порцева ВВ, Шилкин ВВ (2016) Строение серого вещества спинного мозга: неопределенности и перспективы исследования. *Тихоокеанск мед журн* 64: 20–30. [Porseva VV, Shilkin VV (2016) The structure of the gray matter of the spinal cord: uncertainties and research prospects. *Tikhookeansk Med Zhurn* 64: 20–30 (In Russ)].
 48. Leijnse JN, D'Herde K (2016) Revisiting the segmental organization of the human spinal cord. *J Anat* 229: 384–393. <https://doi.org/10.1111/joa.12493>
 49. Carpenter EM (2002) Hox genes and spinal cord development. *Dev Neurosci* 24: 24–34.
<https://doi.org/10.1159/000064943>
 50. Watson C, Sengul G, Tanaka I, Rusznak Z, Tokuno H (2015) The spinal cord of the common marmoset (*Calithrix jacchus*). *Neurosci Res* 93: 164–175.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.12.012>
 51. Romanes GJ (1964) The motor pools of the spinal cord. *Prog Brain Res* 11: 93–119.
[https://doi.org/10.1002/10.1016/s0079-6123\(08\)64045-5](https://doi.org/10.1002/10.1016/s0079-6123(08)64045-5)
 52. Erickson CA, Perris R (1993) The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. *Developmental Biology* 159: 60–74.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1221>
 53. Gerasimenko YP, Makarovskii AN, Nikitin OA (2002) Control of locomotor activity in humans and animals in the absence of supraspinal influences. *Neurosci Behav Physiol* 32: 417–423.
<https://doi.org/10.1023/a:1015836428932>
 54. Ko H-Y, Park JH, Shin YB, Baek SY (2004) Gross quantitative measurements of spinal cord segments in human. *Spinal Cord* 42: 35–40.
<https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101538>
 55. Журавлева ЛД (1979) Возрастная скелетотопия и морфология спинного мозга свиньи. Дисс. на соиск. степ. к. б. н. Ульяновск. 200 с. [Zhuravleva LD (1979) Age-related skeletotopy and morphology of the pig spinal cord. PhD Thesis. Ulyanovsk. 200 p. (In Russ)].
 56. Istaitih AR (1975) Vertebromedullary topography and its postnatal changes in the rat. *Folia Morphologica* 23: 397–403.
 57. Rao GS, Kalt DJ, Koch M, Majok AA (1993) Anatomical studies on the spinal cord segments of the impala (*Aepyceros melampus*). *Anatom Histol Embryol* 22: 273–278.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1993.tb00365.x>
 58. Barson AJ (1970) The vertebral level of termination of the spinal cord during normal and abnormal development. *J Anat* 106: 489–497.
 59. Wolf S, Schneble F, Tröger J (1992) The conus medullaris: Time of ascendance to normal level. *Pediatric Radiol* 22: 590–592.
<https://doi.org/10.1007/BF02015359>
 60. Van Schoor ANV, Bosman MC, Bosenberg AT (2015) Descriptive study of the differences in the level of the conus medullaris in four different age groups. *Clin Anatom* 28: 638–644. <https://doi.org/10.1002/ca.22505>
 61. Ghazi SR, Gholami S (1993) Changes in the termination of spinal cord at vertebral levels during pre- and postnatal development of sheep. *J Appl Animal Res* 4: 61–66.
 62. Gholami S, Ghazi SR, Khaksar Z (1997) Postnatal changes of termination of the spinal cord in camel (*Camelus dromedarius*). *J Appl Animal Res* 11: 69–72.
<https://doi.org/10.1080/09712119.1997.9706162>
 63. Соболевский ЕИ (1978) Сравнительная анатомия спинного мозга полуводных, водных и наземных млекопитающих. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. LXXV: 74–80. [Sobolevskii EI (1978) Comparative anatomy of the spinal cord in semiwater, water and terrestrial mammals. *Arkhir anatomii, gistologii i embriologii*. LXXV: 74–80. (In Russ)].
 64. Hines M, Emerson BM (1951) Development of the spinal cord in the fetal and infant macaque, 1. Growth as increase in size. In *Contributions to embryology* (Vol. 34, pp. 1–18). Carnegie Institution of Washington.
 65. Mellström A, Skoglund S (1969) Quantitative morphological changes in some spinal cord segments during postnatal development. A study in the cat. *Acta Physiol Scandinavica* 331: 1–84.
 66. Фасахутдинова АН, Симанова НГ, Хохлова СН (2015) Морфогенез спинного мозга кролика. *Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана*. 2: 229–233. [Fasakhutdinova AN, Simanova NG, Khokhlova SN (2015) Morphogenesis of the rabbit spinal cord. *Uchenyye zapiski KGAVM im. N. E. Bauman*. 2: 229–233. (In Russ)].
 67. Писалева СГ, Фасахутдинова АН (2008) Возрастные особенности скелетотопии спинного мозга собаки и кролика. *Известия ОГАУ* 20: 117–118. [Pisaleva SG, Fasakhutdinova AN (2008) Age-related features of skeletotopy of the spinal cord of dogs and rabbits. *Izvestiya OGAU* 20: 117–118 (In Russ)].
 68. Maya S, Chungath JJ, Harshan KR, Ashok N (2008) Regional growth of spinal cord and vertebral column in goat fetuses. *Indian J Animal Res* 42: 164–170.
 69. Arthurs OJ, Thayyil S, Wade A, Chong WK, Sebire NJ, Taylor AM, Magnetic resonance imaging autopsy study collaborative group (2013) Normal ascent of the conus medullaris: a post-mortem foetal MRI study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26: 697–702.
<https://doi.org/10.3109/14767058.2012.746307>
 70. Vettivel S (1991) Vertebral level of the termination of the spinal cord in human fetuses. *J Anat* 179: 149–161.
 71. Меньщикова ИА, Кирсанов КП, Мельников НМ (2001) Морфометрия спинного мозга и позвоночного канала экспериментальных животных (собака). *Гений Ортопедии*. 3: 50–52. [Menshchikova IA, Kirsanov KP, Melnikov NM (2001) Morphometry of the spinal cord and spinal canal of experimental animals (dog). *Geniy Ortopedii*. 3: 50–52. (In Russ)].

72. Jones KE, German RZ (2014) Ontogenetic allometry in the thoracolumbar spine of mammal species with differing gait use. *Evol Dev* 16: 110–120.
<https://doi.org/10.1111/ede.12069>
73. Li K, Sun X, Chen M, Sun Y, Tian R, Wang Z, Xu S, Yang G (2018) Evolutionary changes of Hox genes and relevant regulatory factors provide novel insights into mammalian morphological modifications. *Integr Zool* 13: 21–35.
<https://doi.org/10.1111/1749-4877.12271>
74. Galis F, Carrier DR, van Alphen J, van der Mije SD, Van Dooren TJ, Metz JA, ten Broek CM (2014) Fast running restricts evolutionary change of the vertebral column in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11401–11406.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1401392111>
75. Maya S, Sreeranjini AR, Leena C, Sunilkumar NS, Sumeena KB, Irshad A (2020) Developmental morphometry and allometry of spinal cord. *J Food Animal Sci* 01: 7–12.
<https://doi.org/10.51128/jfas.2020.A002>
76. Ghazi SR, Gholami S (1993) A study of the length of the spinal cord in pre- and postnatal life in Mehraban sheep (*Ovis Aries*). *Vet Res Commun* 174: 17–420.
<https://doi.org/10.1007/BF01839209>
77. Ashwell KW, Zhang LL (1997) Cyto- and myeloarchitectonic organisation of the spinal cord of an echidna (*Tachyglossus aculeatus*). *Brain Behav Evol* 49: 276–294.
<https://doi.org/10.1159/000112998>
78. Imam A, Ajao MS, Bhagwandin A, Ihunwo AO, Manger PR (2017) The brain of the tree pangolin (*Manis tricuspis*). I. General appearance of the central nervous system. *J Comp Neurol* 525: 2571–2582.
<https://doi.org/10.1002/cne.25353>
79. Ashwell KW (2013) Peripheral nervous system, spinal cord, brainstem and cerebellum. In K. W. Ashwell (Ed.), *Neurobiology of monotremes: Brain evolution in our distant mammalian cousins* (pp. 69–105). Csiro Publishing.
80. Ridgway SH (2012) The central nervous system of the bottlenose dolphin. In S. Leatherwood & R. R. Reeves (Eds.), *The bottlenose dolphin* (pp. 69–97). Elsevier.
81. Seki Y (1958) Observations on the spinal cord of the right whale. *Sci Rep Whales Res Inst* 3: 231–251.
82. Machado GV, Lesnau GG, Birck AJ (2003) Topografia do cone medular no lobo marinho (*Arctocephalus australis Zimmermann*, 1783). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* 6: 11–14.
83. Kapoun S, Malinska J, Zrzavy J (1973) Anatomical peculiarities of the spinal cord in some Insectivora and Chiroptera. *Folia Morphol* 21: 136–138.
84. Neuweiler G (2000) *The biology of bats*. Oxford University Press.
85. Uehara M, Hosaka YZ, Doi H, Sakai H (2015) The shortened spinal cord in tetraodontiform fishes. *J Morphol* 276: 290–300.
<https://doi.org/10.1002/jmor.20338>
86. Sánchez SS, Sánchez RS (2021) Delineating the anuran axial skeleton. *Int J Dev Biol* 65: 177–186.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.200230ss>
87. Chang HT, Ruch TC (1947) Morphology of the spinal cord, spinal nerves, caudal plexus, tail segmentation, and caudal musculature of the spider monkey. *The Yale J Biol Med* 19: 345–377.
88. de Souza Terra DR, Sabec-Pereira DK, Lima FC, Melo FCSA, Melo FR, Pereira KF (2018) Anatomy of the spinal cord of *Alouatta belzebul*. *Acta Veterinar Brasil* 12: 55–61.
89. Economides KD, Zeltser L, Capecchi MR (2003) Hoxb13 mutations cause overgrowth of caudal spinal cord and tail vertebrae. *Dev Biol* 256: 317–330.
[https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00137-9](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00137-9)
90. Lin AW, Carpenter EM (2003) Hoxa10 and Hoxd10 coordinately regulate lumbar motor neuron patterning. *J Neurobiol* 56: 328–337.
<https://doi.org/10.1002/neu.10239>
91. Wu Y, Wang G, Scott SA, Capecchi MR (2008) Hoxc10 and Hoxd10 regulate mouse columnar, divisional and motor pool identity of lumbar motoneurons. *Development* 135: 171–182.
<https://doi.org/10.1242/dev.009225>
92. Sears K, Maier JA, Sadier A, Sorensen D, Urban DJ (2017) Timing the developmental origins of mammalian limb diversity. *Genesis*. e23079.
<https://doi.org/10.1002/dvg.23079>
93. Gross C, Ellison B, Buchman AS, Terasawa E, Vander Horst VG (2017) A novel approach for assigning levels to monkey and human lumbosacral spinal cord based on ventral horn morphology. *PLoS One* 12: e0177243.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177243>
94. Takahashi Y, Ohtori S, Takahashi K (2010) Somatotopic organization of lumbar muscle-innervating neurons in the ventral horn of the rat spinal cord. *J Anat* 216: 489–495.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01203.x>
95. Nicolopoulos-Stournaras S, Iles JF (1983) Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 217: 75–85.
<https://doi.org/10.1002/cne.902170107>
96. Canty AJ, Greferath U, Turnley AM, Murphy M (2006) Eph tyrosine kinase receptor EphA4 is required for the topographic mapping of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15629–15634.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607350103>
97. Coonan JR, Bartlett PF, Galea MP (2003) Role of EphA4 in defining the position of a motoneuron pool within the spinal cord. *J Comp Neurol* 458: 98–111.
<https://doi.org/10.1002/cne.10571>

COMPARATIVE SKELETOTOPY OF THE MAMMALIANS LUMBAR SPINAL CORD

P. Yu. Shkorbatova, V. A. Lyakhovetskii, A. A. Veshchitskii and N. S. Merkulyeva[#]

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

[#] e-mail: merkulyevan@infran.ru

The spinal cord is the most phylogenetically ancient part of the central nervous system. The more rapid growth of the spine in relation to the spinal cord in ontogenesis leads to the fact that in adult mammals some segments of the spinal cord are shifted rostrally in relation to the eponymous vertebrae, which is called ascension of the spinal cord. Based on literature data, we compared the skeletotopy of the lumbar spinal cord of 17 species of mammals. In 4 species, we also compared the skeletotopy of newborn and adult animals. The ratio of the length of the L2 segment to the length of the VL2 vertebra and the number of the vertebra in which the 29th segment of the spinal cord is located, characterizing the degree of ascension, were determined. Based on literature data, we determined characteristics frequently used in comparative studies: finger dexterity and encephalization coefficient. It has been shown that different species differ to a greater extent in the relative length of the rostral lumbar segments, and within the same species, newborns differ from adults in the relative length of the caudal lumbar segments. For most species, the degree of spinal cord ascension significantly positively correlates with finger dexterity and the encephalization coefficient. The considered macroanatomical characteristics of the spinal cord may be used to analyze the relationships between adaptive mechanisms in various mammalian species.

Keywords: spinal cord, skeletotopy, ascension, digital dexterity, encephalization

ВЛИЯНИЕ ФЕНАНТРЕНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЖЕЛУДОЧКОВЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ ТРЕСКИ (*GADUS MORHUA*)

© 2024 г. Т. С. Филатова¹,*, А. В. Шамшура¹, Д. В. Абрамочкин¹

¹ Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет,
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 12.04.2024 г.

После доработки 29.05.2024 г.

Принята к публикации 31.05.2024 г.

Добыча нефти на арктическом шельфе и ее транспортировка по Северному морскому пути создают повышенные риски загрязнения экосистем морей Арктики нефтью и нефтепродуктами. На сегодняшний день известно, что наиболее токсичными компонентами нефти являются полиароматические углеводороды (ПАУ), и среди них преобладающим по концентрации в нефти и физиологическим эффектам является фенантрен. Фенантрен влияет на электрическую активность сердца рыб, однако его эффекты видоспецифичны. При этом влияние фенантрена на работу сердца рыб Арктики, в том числе экономически важных промысловых видов, исследовано недостаточно. В данной работе рассмотрено влияние фенантрена на электрическую активность и ионные токи в желудочковом миокарде трески (*Gadus morhua*). Основными ионными токами в рабочем миокарде трески были I_{Kr} , I_{K1} , I_{Na} и I_{Ca} . Фенантрен (1 мкМ) не вызывал изменений в длительности потенциалов действия, зарегистрированных в изолированных желудочковых кардиомиоцитах трески методом пэтч-кламп. При этом фенантрен подавлял быстрый ток задержанного выпрямления I_{Kr} на $61.33 \pm 3.94\%$, снижая реполяризационный резерв кардиомиоцитов. Фенантрен не влиял ни на уровень потенциала покоя, ни на фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} . Также в присутствии фенантрена в миоцитах трески снижалась скорость фазы быстрой деполяризации потенциалов действия, что было обусловлено подавлением быстрого натриевого тока I_{Na} . Наконец, фенантрен незначительно снижал амплитуду кальциевого тока I_{Ca} и ускорял его инактивацию, что суммарно приводило к снижению количества заряда, переносимого I_{Ca} . Таким образом, влияние фенантрена на миокард трески на клеточном уровне можно охарактеризовать как потенциально проаритмическое, что делает популяции трески в морях Арктики уязвимыми к загрязнению водной среды компонентами нефти при разливах последней в случае техногенных катастроф.

Ключевые слова: сердце, рыба, полиароматические углеводороды, Арктика, потенциал действия, ионные токи, кардиотоксичность

DOI: 10.31857/S0044452924040043, EDN: YQEDGI

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается интенсификация хозяйственной деятельности в Арктике, и в значительной степени она связана с такими стратегически важными отраслями как рыбная промышленность, а также добыча нефти на континентальном шельфе и ее транспортировка — в том числе по Северному морскому пути [1], что неизбежно влияет на окружающую среду и экосистемы Арктики. Наибольшую опасность для живых организмов при этом представляют утечки нефти и ее компонентов. Токсичность компонентов нефти для живых организмов привлекла внимание экологов и физиологов после нескольких крупных катастроф [2, 3], в том числе и на севере России [4–6]. Таким образом, для живых организмов Арктики создается вполне реальная угроза, и, ввиду интенсификации пере-

возок нефтепродуктов по Северному морскому пути [7], особой опасности подвергаются водные организмы арктических морей — в частности, рыбы.

Отправной точкой для изучения токсических эффектов нефти и ее компонентов послужили работы, показавшие, что воздействие нефти приводит к увеличению смертности молоди рыб, а также к учащению появления дефектов развития — отек желточного мешка, микрофтальмия, искривление позвоночника, мальформации челюсти и пр. [8]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что токсическое действие нефти связано с ограниченным набором низкомолекулярных, относительно растворимых в воде соединений — а именно, с полиароматическими углеводородами (ПАУ). Среди этого класса веществ наиболее представлены в нефти ди- и трициклические соединения [9], а сре-

ди них наиболее высокой концентрацией и токсичностью обладает фенантрен — углеводород, содержащий в своей структуре 3 конденсированных бензольных кольца. Фенантрен способен вызывать не менее сильные тератогенные и токсические эффекты в организме рыб, чем чистая нефть — так, было показано, что токсичность различных смесей ПАУ (включая нефть) зависит от содержания в них трициклических соединений, в частности фенантрена [10, 11].

Важной вехой в изучении токсических эффектов ПАУ и нефти стало открытие кардиотоксичности ПАУ. У эмбрионов рыб воздействие трициклических ПАУ и фенантрена приводит к замедлению частоты сердечных сокращений, увеличению вариабельности диастолических интервалов, нарушению атриовентрикулярного проведения и аритмиям, в конечном итоге снижая сердечный выброс, что указывает на влияние на ионные каналы и транспортеры миокарда. При этом вызванные ПАУ нарушения в работе сердца предшествуют другим дисфункциям и мальформациям, по крайней мере, в организме рыб [12]. В более детальных исследованиях было показано, что фенантрен снижает силу сокращения желудочкового миокарда кумжи [13], а на клеточном уровне — снижает амплитуду кальциевых транзиентов и замедляет их спад [14], что в конечном итоге снижает сократимость сердца и, в перспективе, сердечный выброс. Сходное влияние на сократимость миокарда оказывает и сырая нефть [15]. Также для фенантрена было показано влияние на быстрый натриевый ток I_{Na} , определяющий возбудимость миокарда и скорость проведения возбуждения по нему: в кардиомиоцитах различных видов рыб, как морских, так и пресноводных, фенантрен подавлял I_{Na} [16–18]. Наконец, несколько исследовательских групп показали способность фенантрена и подобных ему ПАУ подавлять быстрый калиевый ток задержанного выпрямления I_{Kr} [13–18], являющийся основным реполяризирующим током в миокарде большинства рыб — и в человеческом миокарде [19]. Однако, сравнительный анализ показывает, что для ингибиторных эффектов фенантрена на те или иные ионные токи характерна определенная видоспецифичность. Так, например, в миокарде радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) с концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) тока I_{Kr} фенантреном составляет порядка 10 мкМ [17], в миокарде данио-рерио (*Danio rerio*) и наваги (*Eleginus nawaga*) IC_{50} фенантрена для подавления I_{Kr} составила 3.3 и около 2 мкМ, соответственно [18, 20], а в желудочковом миокарде европейского керчака (*Myoxocephalus scorpio*) IC_{50} составила всего 144 нМ [16]; аналогичные различия в чувствительности к ПАУ показаны и для других ионных токов в миокарде рыб. Соот-

ветственно, влияние фенантрена на конфигурацию электрической активности миокарда рыб тоже видоспецифично, в зависимости от чувствительности различных ионных токов к фенантрено и их относительного вклада в формирование потенциалов действия (ПД): так, в кардиомиоцитах данио-рерио и радужной форели фенантрен вызывает укорочение ПД [17, 20], тогда как в кардиомиоцитах наваги и европейского керчака — напротив, в присутствии фенантрена длительность ПД увеличивается [16, 18]. Таким образом, предугадать кардиотоксичность фенантрена (и, скорее всего, других ПАУ, содержащихся в нефти) для того или иного вида рыб практически невозможно.

Среди арктических видов рыб эффекты ПАУ были исследованы только в миокарде наваги (*Eleginus nawaga*) и европейского керчака (*Myoxocephalus scorpio*), что явно недостаточно для понимания возможных негативных эффектов от разливов нефти или нефтепродуктов в арктических морях. Еще одним экономически важным для рыбной промышленности арктическим видом рыб является треска (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758). Это всеядные пелагические рыбы средних размеров из семейства тресковых (*Gadidae*), являющиеся одним из самых давно известных промысловых видов рыб и обитающие в северной части Атлантического океана и морях Арктики, от прибрежных вод до континентального шельфа [21, 22]. Учитывая важность трески в рыбном промысле многих стран, представляется крайне важным иметь понимание о возможных рисках для ее популяций в связи с возможным загрязнением океанических вод, в особенности в области арктического шельфа, компонентами нефти. Данное исследование ставило своей целью изучить влияние одного из наиболее токсичных и хорошо изученных ПАУ в составе нефти, фенантрена, на электрическую активность желудочкового миокарда трески (*Gadus morhua*) на клеточном уровне.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Все эксперименты в рамках данного исследования были проведены на Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова (Россия). Взрослые половозрелые особи трески (*Gadus morhua*) обоих полов массой 100–200 г ($n = 7$) были пойманы в Кандалакшском заливе в окрестностях ББС МГУ (66°19'50" с.ш., 33°40'06" в.д.) в июне-августе, когда температура воды составляла 7–12°C. Перед экспериментами животных в течение 7–10 дней содержали в проточном морском аквариуме (объем 200 л) с тем же температурным режимом, что и в природных условиях, при световом режиме

12:12. Животных кормили пескожилами (*Arenicola marina*) каждые 3 дня.

Получение изолированных кардиомиоцитов трески

Для получения изолированных желудочковых кардиомиоцитов трески был использован разработанный и успешно примененный ранее в работах с использованием различных видов рыб Белого моря протокол энзиматической перфузии сердца [18, 23]. Животных оглушали ударом по голове, декапировали, после чего сердце быстро вырезали и канюлировали через аорту для ретроградной перфузии по Лангендорфу. Сердце перфузировали не содержащим Ca^{2+} раствором для выделения [(в мМ): NaCl 100, KCl 10, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4, таурин 50, глюкоза 10, HEPES 10, pH 6.9] в течение 5–7 мин. После этого сердце перфузировали раствором того же состава, содержащим протеолитические ферменты: коллагеназу типа IA (0.37 мг/мл), трипсин (0.15 мг/мл), а также бычий сывороточный альбумин (0.37 мг/мл). После 10–12 мин ферментативной обработки желудочек сердца отделяли от аортального конуса и предсердия, помещали в раствор для выделения, измельчали и пипетировали для высвобождения изолированных кардиомиоцитов в раствор. Изолированные кардиомиоциты хранили при температуре $+4^\circ\text{C}$ и использовали в течение 8 ч после выделения.

Регистрация потенциалов действия и ионных токов методом пэтч-кламп

Изолированные кардиомиоциты (300 мкл суспензии изолированных клеток) помещали в экспериментальную камеру объемом 300 мкл, монтированную на инвертированном микроскопе Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Кардиомиоциты суперфузировали внеклеточным раствором, состав которого различался в зависимости от типа эксперимента, со скоростью около 1.5 мл/мин. Температуру раствора в камере поддерживали на уровне 7°C с помощью терморегулятора CL-100 с элементом Пельтье (Wagner Instruments, США). Фенантрен в ходе экспериментов добавляли во внеклеточный раствор. Маточный раствор фенантрена (10 мМ) готовили на основе диметилсульфоксида (ДМСО) и использовали в течение 48 ч после приготовления. Концентрация ДМСО во внеклеточном растворе в каждом из экспериментов не превышала 1:1000. Пипетки вытягивали из боросиликатных стеклянных капилляров без филамента (World Precision Instruments, США) с помощью пуллера PC-100 (Narishige, Япония) и заполняли пипеточным раствором, состав которого также различался в зависимости от типа эксперимента. Соппротивление пипеток, заполненных раствором, составляло 2–3 МΩ. Ионные то-

ки и потенциалы действия (ПД) регистрировали с использованием метода whole-cell пэтч-кламп с помощью усилителя Axopatch 200A (Molecular Devices, США). Соппротивление доступа и емкость клетки компенсировали перед непосредственной регистрацией ионных токов или потенциалов действия. Протоколы изменения потенциала указаны на соответствующих рисунках. Регистрацию тока начинали спустя 1 мин после установления whole-cell контакта с клеткой. Ток регистрировали в контрольных условиях в течение не менее чем 3 мин, после достижения стационарной амплитуды тока. При проведении эксперимента ток регистрировали в течение всего времени подачи фенантрена в экспериментальную камеру, эффект оценивали после выхода амплитуды тока на стационарный уровень.

Экспериментальные растворы

Для регистрации калиевых токов и ПД в изолированных кардиомиоцитах трески использовали внеклеточный раствор, содержащий KCl [(в мМ): NaCl 150, KCl 3.5, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, глюкоза 10, HEPES 10, pH 7.6]. Раствор для регистрации калиевых токов дополнительно содержал нифедипин (10 мкМ) для подавления кальциевого тока и тетродотоксин (300 нМ) для подавления быстрого натриевого тока. При регистрации быстрого калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kr} в конце каждого эксперимента также к внеклеточному раствору добавляли 1 мкМ блокатора I_{Kr} E-4031 для оценки полной амплитуды тока. Пипеточный раствор, используемый для регистрации калиевых токов, также содержал KCl [(в мМ): KCl 140, MgCl_2 1, ЭГТА 5, Mg-АТФ 4, $\text{Na}_2\text{-ГТФ}$ 0.03, HEPES 10, pH 7.2]. Для регистрации ПД использовали пипеточный раствор сходного состава, но со сниженной концентрацией ЭГТА (0.025 мМ) для более точной имитации буферной способности цитоплазмы [24].

Для регистрации кальциевого тока I_{Ca} использовали внеклеточный раствор с эквивалентной заменой KCl на CsCl для подавления калиевых токов [(в мМ): NaCl 150, CsCl 3.5, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, глюкоза 10, HEPES 10, pH 7.6]. Для подавления быстрого натриевого тока раствор дополнительно содержал 300 нМ тетродотоксина. В пипеточном растворе для регистрации кальциевого тока KCl также был заменен на CsCl, а также был добавлен тетраэтиламмоний для подавления калиевых токов [(в мМ): CsCl 130, MgCl_2 1, ЭГТА 5, Mg-АТФ 4, $\text{Na}_2\text{-ГТФ}$ 0.03, HEPES 10, тетраэтиламмоний 15, pH 7.2].

Для регистрации быстрого натриевого тока I_{Na} использовали внеклеточный раствор на основе CsCl и с частичной заменой NaCl на Трис-Cl [(в мМ): NaCl 20, Трис-Cl 120, CsCl 3.5, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, глюкоза 10, HEPES 10, pH 7.6]. Раствор дополнительно содержал 10 мкМ нифедипина для подавления кальциевого то-

ка. Пипеточный раствор на основе CsCl также содержал NaCl [(в mM): CsCl 130, NaCl 5, MgCl₂ 1, ЭГТА 5, Mg-АТФ 4, Na₂-ГТФ 0.03, HEPES 10, pH 7.2]; снижение концентрации NaCl во внеклеточном растворе и добавление его в пипеточный раствор позволило снизить движущую силу для входа ионов Na⁺. В совокупности с 70% компенсацией последовательного сопротивления это позволило обеспечить стабильную и адекватную регистрацию высокоамплитудного I_{Na} .

Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы и блокаторы: блокатора I_{Na} тетродотоксин, блокатор I_{Ca} нифедипин, коллагеназа типа IA, трипсин, фенантрен (Sigma, США), блокатор I_{Kr} E-4031 (Tocris Bioscience, Великобритания).

Анализ данных

Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США) с последующей статистической обработкой в среде GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). При анализе ПД учитывали такие параметры как максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД, амплитуду ПД и длительность ПД на уровнях реполяризации 50% и 90%. Амплитуду токов нормировали на электрическую емкость клеток и представляли в виде пА/пФ. Заряд, переносимый кальциевым током I_{Ca} , оценивали по площади под кривой интегрального тока, нормированного на емкость клетки, и представляли в виде пКл/пФ. Временную константу инактивации τ для тока I_{Ca} оценивали с помощью стандартной трансформации Чебышева в программном обеспечении Clampfit 10.3, используя экспоненциальную функцию. Данные представлены как среднее $\pm$ ст. ошибка среднего ($M \pm S.E.M.$). Нормальность распределения выборок оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку данные были распределены нормально, статистическую значимость эффектов фенантрена оценивали с помощью t -теста Стьюдента для связанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Действие фенантрена на конфигурацию ПД в миокарде трески

В первую очередь мы оценили интегральный эффект фенантрена на конфигурацию электрической активности — а именно, на форму потенциалов действия (ПД) в миокарде трески. ПД регистрировали в режиме поддержания тока (current-clamp) в

изолированных желудочковых кардиомиоцитах. Репрезентативные примеры ПД, зарегистрированных в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена во внеклеточном растворе, представлены на рис. 1а. Несмотря на отсутствие видимых глазу изменений, в присутствии 1 мкМ фенантрена фаза быстрой деполяризации ПД удлинялась, что отражено в снижении максимальной скорости нарастания переднего фронта ПД (рис. 1b, c). Прочие оцениваемые параметры, а именно мембранный потенциал покоя и длительность ПД на уровне 90% и 50% реполяризации в присутствии 1 мкМ фенантрена не изменялись (рис. 1d-f, соответственно).

Действие фенантрена на ток I_{Kr} в желудочковых миоцитах трески

Поскольку ранее проведенные исследования показали чувствительность быстрого калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kr} , являющегося основным реполяризующим током в миокарде рыб, к ПАУ и, в частности, к фенантрено [13, 14, 16, 17], то, несмотря на отсутствие заметных изменений в длительности ПД в присутствии 1 мкМ фенантрена, мы оценили влияние фенантрена на I_{Kr} в миокарде трески.

Деполяризация от -80 мВ до -20 мВ и более положительных потенциалов приводила к активации выходящего тока, чувствительного к селективному блокатору E-4031 (1 мкМ) и определенного как быстрый ток задержанного выпрямления I_{Kr} (рис. 2а). Поскольку для каналов, опосредующих ток I_{Kr} , характерна быстрая инактивация С-типа [25], ток регистрировали с помощью двухступенчатого протокола (показан на рис. 2) и измеряли на второй ступени пиковую амплитуду тока, подавляемого E-4031 (так называемый хвостовой ток или tail current). Вольт-амперная характеристика I_{Kr} в желудочковых миоцитах трески отражена на рис. 2b.

Фенантрен в концентрации 1 мкМ вызывал снижение амплитуды I_{Kr} , особенно заметное на второй ступени протокола (см. рис. 2b, c). Снижение амплитуды I_{Kr} под действием фенантрена было статистически значимым и составило более 50% от контрольных значений, эффект наблюдался начиная с 3-й минуты подачи раствора, содержащего фенантрен, в экспериментальную камеру.

Фенантрен не влияет на ток I_{K1} в желудочковом миокарде трески

Фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} в желудочковых миоцитах трески регистрировали с использованием пилообразного протокола (показан на рис. 3). Вольт-амперная характеристика I_{K1} в желудочковом миокарде трески отражена на рис. 3а.

В отличие от тока I_{Kr} , ток входящего выпрямления I_{K1} оказался нечувствителен к действию фенан-

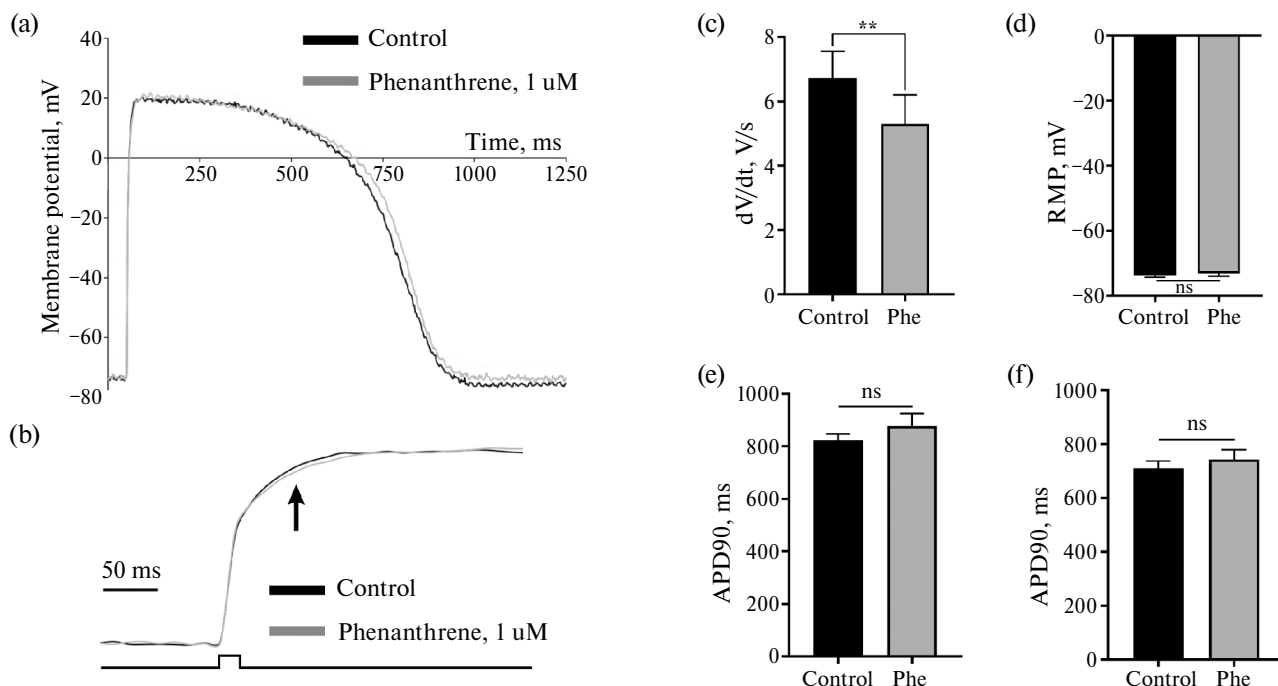


Рис. 1. Влияние фенантрена на конфигурацию ПД в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — репрезентативные записи ПД в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена; (b) — репрезентативная запись, отражающая замедление фазы быстрой деполяризации ПД в присутствии 1 мкМ фенантрена, черная линия снизу отображает электрический стимул, стрелка отмечает область интереса; (c) — влияние 1 мкМ фенантрена на максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД ($n = 6$; $p < 0.01$, парный t -тест Стьюдента); (d) — влияние 1 мкМ фенантрена на мембранный потенциал покоя ($n = 6$; $p = 0.11$, парный t -тест Стьюдента); (e) — влияние 1 мкМ фенантрена на длительность ПД на уровне 90% реполяризации ($n = 6$; $p = 0.20$, парный t -тест Стьюдента); (f) — влияние 1 мкМ фенантрена на длительность ПД на уровне 5% реполяризации ($n = 6$; $p = 0.07$, парный t -тест Стьюдента).

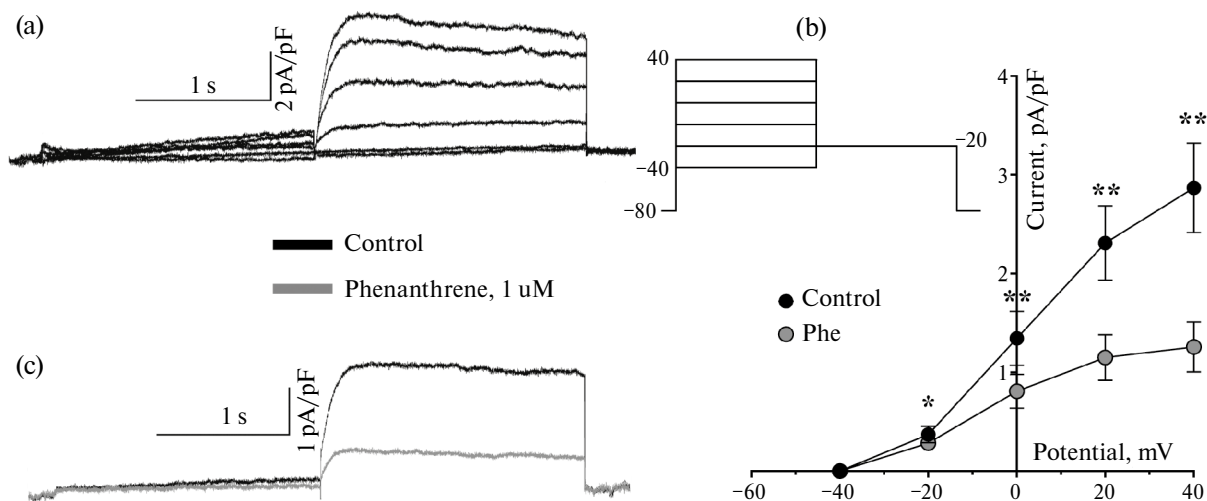


Рис. 2. Влияние фенантрена на быстрый калиевый ток задержанного выпрямления I_{Kr} в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — репрезентативные записи I_{Kr} ; (b) — вольт-амперная характеристика I_{Kr} в желудочковых кардиомиоцитах трески в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена ($n = 6$ для обеих групп; $**p < 0.01$, $*p < 0.05$, парный t -тест Стьюдента); (c) — репрезентативные записи I_{Kr} (при 40 мВ) в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена.

трена: не было замечено каких-либо изменений в амплитуде I_{K1} . Репрезентативные примеры записей I_{K1} в контрольных условиях и под действием 1 мкМ фенантрена представлены на рис. 3b.

Действие фенантрена на быстрый натриевый ток I_{Na} в желудочковых миоцитах трески

Быстрый натриевый ток I_{Na} , ответственный за фазу быстрой реполяризации ПД в миокарде по-

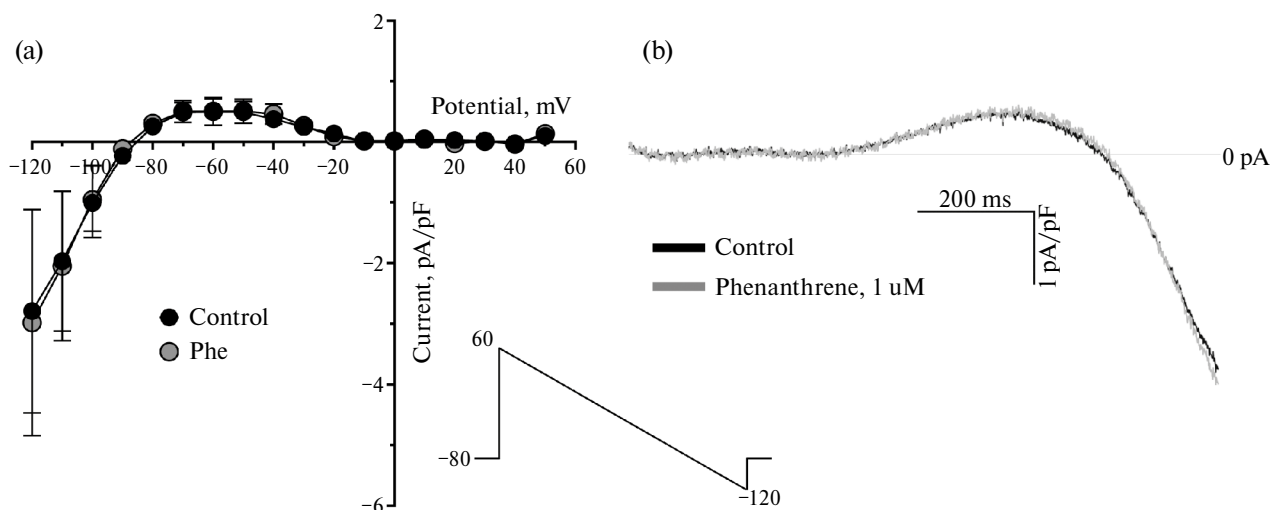


Рис. 3. Влияние фенантрена на фоновый калиевый ток входящего выпрямления I_{K1} в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — вольт-амперная характеристика тока I_{K1} в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена ($n = 6$ для обеих групп, $p > 0.05$ для всех потенциалов, парный t -тест Стьюдента); (b) — репрезентативные записи I_{K1} в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена.

звоночных, регистрировали с использованием протокола ступенчатой деполяризации от поддерживаемого потенциала -120 мВ (показан на рис. 4). Репрезентативный пример записи тока I_{Na} в рабочем миокарде трески представлен на рис. 4а. I_{Na} в миоцитах трески активировался при мембранных потенциалах положительнее -70 мВ; максимум амплитуды входящего тока наблюдался при -30 мВ. Вольт-амперная характеристика I_{Na} в кардиомиоцитах трески отражена на рис. 4б.

Фенантрен в концентрации 1 мкМ относительно слабо снижал амплитуду I_{Na} и не оказывал влияния на кинетику и инактивацию тока (см. рис. 4б, 4с). Снижение амплитуды I_{Na} под действием фенантрена составило $11.47 \pm 3.19\%$ относительно контрольных значений. Эффект наблюдался начиная с 6-й минуты подачи раствора, содержащего фенантрен, в экспериментальную камеру.

Действие фенантрена на вход кальция в желудочковых миоцитах трески

Кальциевый ток L-типа в изолированных кардиомиоцитах трески регистрировали при ступенчатой деполяризации от поддерживаемого потенциала -80 мВ (см. рис. 5) в присутствии 300 нМ тетродотоксина во внеклеточном растворе для подавления I_{Na} . Репрезентативный пример оригинальных записей I_{Ca} представлен на рис. 5а. Максимум амплитуды входящего I_{Ca} наблюдался при потенциале -10 мВ; вольт-амперная характеристика I_{Ca} в желудочковом миокарде трески отражена на рис. 5б.

Фенантрен (1 мкМ) во внеклеточном растворе крайне слабо влиял на амплитуду I_{Ca} : в присутствии фенантрена пиковая амплитуда I_{Ca}

снижалась на $15.54 \pm 7.64\%$; различия были статистически незначимыми. Кроме того, под действием фенантрена кинетика инактивации I_{Ca} имела тенденцию к ускорению, однако снижение временной константы инактивации τ под действием фенантрена также оказалось статистически незначимым (см. рис. 5д). Однако, несмотря на то что изменения этих параметров по отдельности были статистически незначимыми, анализ количества заряда, переносимого I_{Ca} , показал, что воздействие фенантрена приводит к статистически значимому снижению суммарного входа кальция — на $25.17 \pm 5.73\%$ (рис. 5е). Описываемый эффект наблюдался начиная с 5-й минуты подачи раствора, содержащего фенантрен, в экспериментальную камеру.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данная работа впервые рассматривает электрическую активность сердца трески (*Gadus morhua*), а также влияние на нее фенантрена — одного из наиболее известных токсичных компонентов нефти. Несмотря на многолетний опыт исследований нашей научной группы на арктических видах рыб, в том числе на рыбах семейства тресковых (*Gadidae*) [18, 26], электрическая активность сердца трески (*Gadus morhua*) практически не изучена. При этом треска является широко распространенным видом рыб и играет важную экономическую, экологическую и культурную роль для многих стран — и отчасти именно благодаря этому сталкивается со значительными изменениями среды обитания, в том числе антропогенными [27].

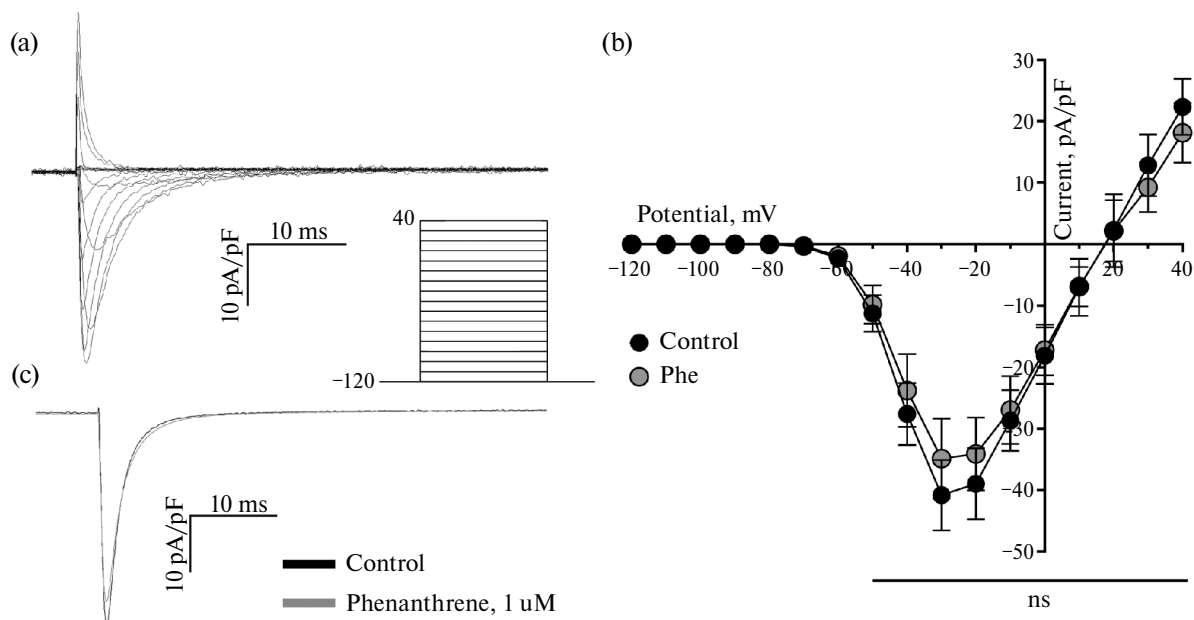


Рис. 4. Влияние фенантрена на быстрый натриевый ток I_{Na} в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — репрезентативные записи I_{Na} ; (b) — вольт-амперная характеристика I_{Na} в желудочковых кардиомиоцитах трески в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена ($n = 7$ для обеих групп, $p > 0.05$ для всех потенциалов, парный t -тест Стьюдента); (c) — репрезентативные записи I_{Na} (при -30 мВ) в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена.

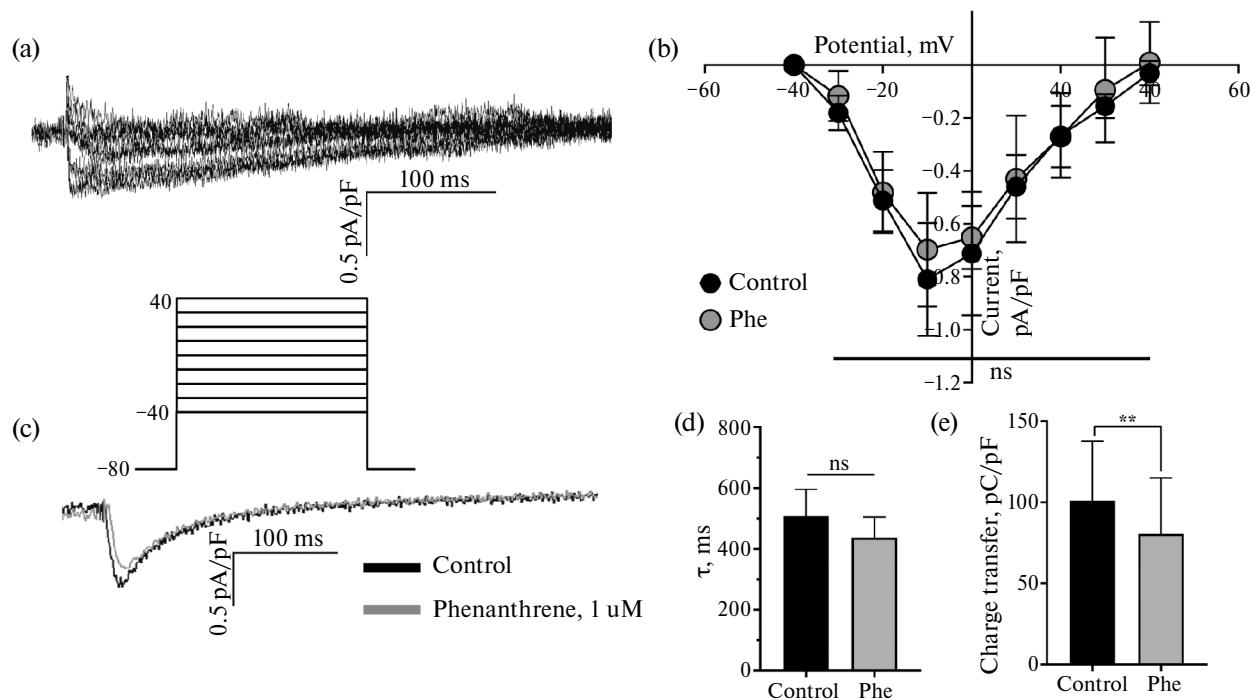


Рис. 5. Влияние фенантрена на кальциевый ток I_{Ca} в желудочковых кардиомиоцитах трески. (a) — репрезентативные записи I_{Ca} ; (b) — вольт-амперная характеристика I_{Ca} в желудочковых кардиомиоцитах трески в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена ($n = 5$ для обеих групп, $p > 0.05$ для всех потенциалов, парный t -тест Стьюдента); (c) — репрезентативные записи I_{Ca} (при -10 мВ) в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ фенантрена; (d) — влияние 1 мкМ фенантрена на временную константу инактивации I_{Ca} при -10 мВ ($n = 5$; $p = 0.22$, парный t -тест Стьюдента); (e) — влияние 1 мкМ фенантрена на суммарный заряд, переносимый I_{Ca} при -10 мВ ($n = 5$; $p < 0.01$, парный t -тест Стьюдента).

Электрическая активность желудочкового миокарда трески (форма ПД, уровень мембранного потенциала покоя) имела типичный для тресковых рыб вид; длительность ПД при 9°C , была близка к

таковой у наваги (*Eleginus nawaga*) и налима (*Lota lota*), но несколько выше, чем у полярной тресочки (*Boreogadus saida*), более stenothermного вида рыб [26]. Электрофизиологический фенотип, а именно,

набор ионных токов, формирующих электрическую активность миокарда, у трески был типичен для костистых рыб и включал четыре основных тока: I_{Kr} , I_{K1} , I_{Na} и I_{Ca} [19]. Литературные данные позволяют провести сравнение с другими тресковыми, но нужно отметить, что температурный режим в разных исследованиях не всегда совпадает, тогда как большинство ионных токов зависят от температуры. Основным реполяризирующим током в рабочем миокарде трески был быстрый ток задержанного выпрямления I_{Kr} ; его вольт-амперная зависимость и амплитуда были близки к таковым в желудочковых миоцитах других тресковых рыб — наваги и налима [18, 28]. Фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} в желудочковых миоцитах трески имел относительно небольшую амплитуду — приблизительно такую же, как в миокарде налима и наваги [29, 30] и заметно ниже, чем у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) или карася (*Carassius carassius*) [31]. Вероятно, низкая амплитуда I_{K1} является характерной чертой тресковых рыб. Быстрый натриевый ток I_{Na} в миокарде трески не отличался от такового в миокарде наваги и налима [18, 32]. Кальциевый ток L-типа в миокарде трески имел крайне низкую амплитуду, не превышающую -1 пА/пФ; максимум амплитуды I_{Ca} соответствовал потенциалу -10 мВ. Имеющиеся литературные данные не позволяют оценить форму вольт-амперных характеристики I_{Ca} в миоцитах наваги — однако, амплитуда I_{Ca} в миокарде этих двух видов рыб, по всей видимости, сопоставима [33]. В желудочковом миокарде налима I_{Ca} также имеет относительно небольшую амплитуду — при 11°C максимальная амплитуда тока была немногим выше -1 пА/пФ; можно предположить, что при температуре 9°C она не будет отличаться от амплитуды I_{Ca} в миокарде наваги и трески [30]. Интересно, однако, что максимум амплитуды I_{Ca} в миоцитах трески и наваги смещен в сторону более отрицательных потенциалов по сравнению с налимом (-10 мВ и 10 мВ, соответственно) — вероятно, сарколеммальный кальциевый ток в миокарде тресковых рыб может опосредоваться разными изоформами кальциевых каналов [34]. Таким образом, полученные данные в совокупности с имеющейся в литературе информацией указывают на то, что электрофизиологические аспекты функционирования сердца рыб — по крайней мере, тресковых — определяются как филогенетическим родством, так и, по всей видимости, особенностями занимаемой конкретным видом экологической ниши. Навага и треска являются солоноводными эвритермами, в то время как налим обитает в пресных водоемах при температурах, не превышающих 13°C . Можно предположить, что вольт-амперная зависимость кальциевого тока с максимумом при более положительных потенциалах может ограничивать вход

кальция и препятствовать кальциевой перегрузке при генерации ПД в миокарде налима при низких температурах.

Также в рамках данной работы мы впервые оценили влияние фенантрена на электрическую активность желудочкового миокарда трески. Фенантрен, как показали многочисленные работы [12–14, 20], оказывает проаритмическое влияние на миокард рыб, нарушая тем самым насосную функцию сердца. Однако, конкретные изменения паттерна электрической активности сердца рыб в присутствии фенантрена видоспецифичны. Ранее электрофизиологические эффекты фенантрена были достаточно подробно исследованы в рабочем миокарде наваги [18], и сравнение этих данных с результатами настоящего исследования позволит ответить на вопрос о том, насколько видоспецифичны эффекты ПАУ (на примере фенантрена) в рамках одного семейства рыб.

Как у наваги, так и у трески фенантрен в концентрации 1 мкМ довольно слабо влиял на конфигурацию ПД: в желудочковых миоцитах наваги фенантрен вовсе не вызывал статистически значимых изменений какого-либо из анализируемых параметров. У трески, однако, под действием фенантрена происходило статистически значимое замедление нарастания переднего фронта ПД. Форма ПД и ее изменения под действием ПАУ зависят от воздействия ПАУ непосредственно на каналы, опосредующие деполяризирующие (I_{Na} и I_{Ca}) и реполяризирующие (I_{Kr} и I_{K1}) ионные токи. И, поскольку выше было показано, что электрофизиологический фенотип желудочкового миокарда трески и наваги весьма близки, наблюдаемые различия во влиянии фенантрена на форму ПД могут быть связаны с возможным различием в чувствительности определенных ионных каналов к ПАУ. В самом деле, в миокарде наваги 1 мкМ фенантрена не вызывал статистически значимых изменений в амплитуде I_{Na} [18] — тогда как в миокарде трески под действием 1 мкМ фенантрена происходило статистически значимое снижение амплитуды I_{Na} более чем на 10% .

Одним из основных эффектов фенантрена (и, видимо, других ПАУ) в миокарде рыб является подавление быстрого тока задержанного выпрямления I_{Kr} [14, 16, 20]. В миокарде трески I_{Kr} также оказался наиболее чувствителен к ПАУ: фенантрен в концентрации 1 мкМ подавлял ток на $61.33 \pm 3.94\%$. В проведенном ранее исследовании I_{Kr} в миокарде наваги был значительно менее чувствителен к фенантрону, и 1 мкМ подавлял ток менее, чем на 40% [18]. С одной стороны, можно предположить наличие определенных межвидовых различий в строении каналов ERG, опосредующих ток I_{Kr} , у трески и наваги, влекущее за собой различия в связывании молекул фенантрена порообразующей субъедини-

цей канала. С другой стороны, при проведении подобных экологических исследований, включающих поимку животных в естественной среде обитания, нужно принимать во внимание множество факторов, и, поскольку данные два исследования были разделены во времени значительным сроком, нельзя полностью исключать возможность ремоделирования и изменения чувствительности животных к фенантрону по не зависящим от исследователей причинам — поскольку проведенные в течение последнего года исследования демонстрируют достаточно высокую чувствительность $I_{кр}$ в миокарде различных видов арктических рыб к различным ПАУ [16, 33].

Нужно отметить, что, несмотря на достаточно высокую чувствительность $I_{кр}$ в миокарде трески к фенантрону, его подавление 1 мкМ фенантрона не приводило к значимым изменениям в длительности ПД. Для сравнения, аналогичная степень подавления $I_{кр}$ в миокарде европейского керчака (*Myoxocephalus scorpio*) в присутствии 1 мкМ фенантрона приводила к почти двукратному увеличению длительности ПД [16]. С одной стороны, это можно объяснить тем, что в миокарде трески фенантрен также в некоторой степени подавляет кальциевый ток L-типа, что противоположным образом влияет на длительность ПД. С другой стороны, абсолютная амплитуда $I_{кр}$ в миокарде тресковых рыб заметно выше, чем у керчака, поэтому можно предположить, что заметная доля $I_{кр}$ в миокарде тресковых рыб, ведущих более подвижный образ жизни и, предположительно, сталкивающихся с потребностью развивать более высокую частоту сердечных сокращений, составляет так называемый реполяризационный резерв [35]. Соответственно, можно предполагать, что при более высокой частоте сердечного ритма, сопряженной со значительным укорочением ПД — например, при повышении температуры окружающей среды — проаритмогенный эффект фенантрона будет выражен более явно.

Таким образом, данное исследование демонстрирует, что несмотря на некоторую общность эффектов фенантрона в рабочем миокарде тресковых рыб (а именно, трески и наваги), эффекты фенантрона в миокарде трески были выражены более явно, что может свидетельствовать о более высокой чувствительности популяции трески в арктических морях к загрязнению водной среды компонентами нефти и ПАУ.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов — Д.В.А., сбор данных — А.В.Ш., Т.С.Ф., Д.В.А., обработка данных — А.В.Ш., Т.С.Ф., Д.В.А., написание и редактирование рукописи статьи — Т.С.Ф., Д.В.А.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии МГУ по биоэтике. Протоколы содержания животных и экспериментов с использованием животных одобрены Комиссией МГУ по биоэтике.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №22-14-00075).

В работе было использовано оборудование, приобретенное МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках федерального проекта «Развитие инфраструктуры для научных исследований и подготовки кадров» национального проекта «Наука и университеты» от 29.12.2022г №15-пр/42 (Соглашение №355 от 15.03.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dmitrieva D, Romasheva N (2020) Sustainable Development of Oil and Gas Potential of the Arctic and Its Shelf Zone: The Role of Innovations. J Mar Sci Eng 8:1003. <https://doi.org/10.3390/JMSE8121003>
2. Hose JE, McGurk MD, Marty GD, Hinton DE, Brown ED, Baker TT (1996) Sublethal effects of the (Exxon Valdez) oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989–1991. Can J Fish Aquat Sci 53:2355–2365. <https://doi.org/10.1139/F96-174>
3. McGurk MD, Brown ED (1996) Egg–larval mortality of Pacific herring in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Can J Fish Aquat Sci 53:2343–2354. <https://doi.org/10.1139/F96-172>
4. Gulas S, Downton M, D'Souza K, Hayden K, Walker TR (2017) Declining Arctic Ocean oil and gas developments: Opportunities to improve governance and environmental pollution control. Mar Policy 75:53–61. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOL.2016.10.014>
5. Walker TR, Crittenden PD, Young SD, Prystina T (2006) An assessment of pollution impacts due to the oil and gas industries in the Pechora basin, north-eastern European Russia. Ecol Indic 6:369–387. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2005.03.015>
6. Rajendran S, Sadooni FN, Al-Kuwari HAS, Oleg A, Govil H, Nasir S, Vethamony P (2021) Monitoring oil spill in Norilsk, Russia using satellite data. Sci Rep 11:1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83260-7>

7. *Bambulyak A, Ehlers S* (2020) Oil spill damage: a collision scenario and financial liability estimations for the Northern Sea Route area. *Sh Technol Res* 148–164. <https://doi.org/10.1080/09377255.2020.1786932>
8. *Carls MG, Rice SD, Hose JE* (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ Toxicol Chem* 18:481–493. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620180317>
9. *Lawal AT* (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environ Sci* 3:1339841
10. *Xu K, Zhang Y, Zheng J, Wang C, Chen R* (2023) Comparative Toxicity of 3–5 Ringed Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Skeletal Development in Zebrafish Embryos and the Possible Reason. *Bull Environ Contam Toxicol* 110:8. <https://doi.org/10.1007/S00128-022-03644-X/TABLES/2>
11. *Incardona JP, Collier TK, Scholz NL* (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 196:191–205. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2003.11.026>
12. *Incardona JP, Carls MG, Day HL, Sloan CA, Bolton JL, Collier TK, Schoiz NL* (2009) Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering. *Environ Sci Technol* 43:201–207. https://doi.org/10.1021/ES802270T/SUPPL_FILE/ES802270T_SI_004.PDF
13. *Ainerua MO, Tinwell J, Kompella SN, Sørhus E, White KN, van Dongen BE, Shiels HA* (2020) Understanding the cardiac toxicity of the anthropogenic pollutant phenanthrene on the freshwater indicator species, the brown trout (*Salmo trutta*): From whole heart to cardiomyocytes. *Chemosphere* 239:124608. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124608>
14. *Brette F, Shiels HA, Galli GLJ, Cros C, Incardona JP, Scholz NL, Block BA* (2017) A Novel Cardiotoxic Mechanism for a Pervasive Global Pollutant. *Sci Rep* 7:41476. <https://doi.org/10.1038/srep41476>
15. *Brette F, Machado B, Cros C, Incardona JP, Scholz NL, Block BA* (2014) Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Science* (80-) 343:772–776. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1242747>
16. *Filatova TS, Mikhailova VB, Guskova VO, Abramochkin DV* (2023) The Effects of Phenanthrene on the Electrical Activity in the Heart of Shorthorn Sculpin (*Myoxocephalus scorpio*). *J Evol Biochem Physiol* 2022 581 58:S44–S51. <https://doi.org/10.1134/S0022093022070055>
17. *Vehniäinen ER, Haverinen J, Vornanen M* (2019) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Phenanthrene and Retene Modify the Action Potential via Multiple Ion Currents in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Cardiac Myocytes. *Environ Toxicol Chem* 38:2145–2153. <https://doi.org/10.1002/ETC.4530>
18. *Abramochkin D V, Kompella SN, Shiels HA* (2021) Phenanthrene alters the electrical activity of atrial and ventricular myocytes of a polar fish, the Navaga cod. *Aquat Toxicol* 235:105823. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2021.105823>
19. *Abramochkin D V, Filatova TS, Pustovit KB, Voronina YA, Kuzmin VS, Vornanen M* (2022) Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 268:111204. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2022.111204>
20. *Kompella SN, Brette F, Hancox JC, Shiels HA* (2021) Phenanthrene impacts zebrafish cardiomyocyte excitability by inhibiting IKr and shortening action potential duration. *J Gen Physiol* 153:e202012733. <https://doi.org/10.1085/JGP.202012733/211701>
21. *Troell M, Eide A, Isaksen J, Hermansen Ø, Crépin AS* (2017) Seafood from a changing Arctic. *Ambio* 46:368–386. <https://doi.org/10.1007/S13280-017-0954-2/TABLES/5>
22. *Gadus morhua*, Atlantic cod: fisheries, aquaculture, gamefish. <https://fishbase.mnhn.fr/summary/69>. Accessed 15 Mar 2024
23. *Abramochkin DV, Vornanen M* (2017) Seasonal changes of cholinergic response in the atrium of Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*). *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 187:329–338. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1032-y>
24. *Hove-Madsen L, Tort L* (1998) L-type Ca²⁺ current and excitation-contraction coupling in single atrial myocytes from rainbow trout. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 275:R2061–R2069. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.6.R2061>
25. *Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC* (1996) Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen Physiol* 107:611–619. <https://doi.org/10.1085/JGP.107.5.611>
26. *Abramochkin DV, Haverinen J, Mitenkov YAYA, Vornanen M* (2019) Temperature and external K⁺ dependence of electrical excitation in ventricular myocytes of cod-like fishes. *J Exp Biol* 222:jeb193607. <https://doi.org/10.1242/JEB.193607/259631/AM/TEMPERATURE-AND-EXTERNAL-K-DEPENDENCE-OF>
27. *Link JS, Bogstad B, Sparholt H, Lilly GR* (2009) Trophic role of Atlantic cod in the ecosystem. *Fish Fish* 10:58–87. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00295.x>
28. *Shiels HA, Paajanen V, Vornanen M* (2006) Sarcolemmal ion currents and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in ventricular myocytes from the cold stenothermic fish, the burbot (*Lota lota*). *J Exp Biol* 209:3091–3100. <https://doi.org/10.1242/jeb.02321>
29. *Abramochkin DV, Vornanen M* (2015) Seasonal acclimatization of the cardiac potassium currents (IK1 and IKr) in an arctic marine teleost, the navaga cod (*Eleginus navaga*). *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 185:883–890. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0925-5>
30. *Shiels HA, Paajanen V, Vornanen M* (2006) Sarcolemmal ion currents and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in ventricular myocytes from the cold stenothermic fish, the burbot (*Lota lota*). *J Exp Biol* 209:3091–3100. <https://doi.org/10.1242/jeb.02321>

31. *Haverinen J, Vornanen M* (2009) Responses of Action Potential and K^+ Currents to Temperature Acclimation in Fish Hearts: Phylogeny or Thermal Preferences? *Physiol Biochem Zool* 82:468–482.
<https://doi.org/10.1086/590223>
32. *Haverinen J, Vornanen M* (2004) Temperature acclimation modifies Na^+ current in fish cardiac myocytes. *J Exp Biol* 207:2823–2833.
<https://doi.org/10.1242/jeb.01103>
33. *Abramochkin D V, Filatova TS, Kuzmin VS, Voronkov YI, Kamkin A, Shiels HA* (2023) Tricyclic hydrocarbon fluorene attenuates ventricular ionic currents and pressure development in the navaga cod. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 273:109736.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109736>
34. *Mesirca P, Torrente AG, Mangoni ME* (2015) Functional role of voltage gated Ca^{2+} channels in heart automaticity. *Front Physiol* 6:19.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00019>
35. *Varró A, Baczkó I* (2011) Cardiac ventricular repolarization reserve: a principle for understanding drug-related proarrhythmic risk. *Br J Pharmacol* 164:14–36.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01367.x>

THE EFFECTS OF PHENANTHRENE ON ELECTRICAL ACTIVITY IN VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES OF ATLANTIC COD (*GADUS MORHUA*)

T. S. Filatova^{a, #}, A. V. Shamshura^a and D. V. Abramochkin^a

^a Department of Human and Animal Physiology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[#] e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru

The production of oil on the Arctic shelf and its transport along the Northern Sea Route increase risks of pollution of the ecosystems in the Arctic seas with oil and oil products. Today, polyaromatic hydrocarbons are known as the most toxic oil components, and phenanthrene is predominant in terms of its concentration in oil and physiological effects. Phenanthrene affects the electrical activity of fish heart, but its effects are species-specific. At the same time, the effects of phenanthrene on cardiac function in Arctic fishes, including economically important commercial species, are studied not enough. This study examines the effects of phenanthrene on electrical activity and ionic currents in ventricular myocardium of Atlantic cod (*Gadus morhua*). The major ionic currents in cod myocardium were I_{Kr} , I_{K1} , I_{Na} and I_{Ca} . Phenanthrene (1 μ M) did not affect the duration of action potentials (APs) recorded in isolated cod ventricular cardiomyocytes using patch clamp method. Meanwhile, phenanthrene suppressed rapid delayed rectifier current I_{Kr} by $61.33 \pm 3.94\%$, decreasing the repolarization reserve of the myocardium. Phenanthrene did not affect nor the level of resting membrane potential, not background inward rectifier current I_{K1} . Also, application of phenanthrene decreased AP upstroke velocity in cod myocytes, which was due to the suppression of fast sodium current I_{Na} . Finally, phenanthrene slightly reduced the amplitude of calcium current I_{Ca} and accelerated its inactivation, which overall led to the decrease in I_{Ca} charge transfer. Thus, the effects of phenanthrene on cod myocardium at cellular level can be described as potentially proarrhythmic, which makes the populations of cod in Arctic seas vulnerable to pollution of the aquatic environment by oil components after oil spills due to technological disasters.

Keywords: heart, fish, polyaromatic hydrocarbons, Arctic, action potential, ionic currents, cardiotoxicity

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ Ca^{2+} -СЕНСОРНЫХ БЕЛКОВ В ДВИГАТЕЛЬНОЙ МУСКУЛАТУРЕ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *LUMBRICUS TERRESTRIS*

© 2024 г. Л. Ф. Нуруллин^{1, 2, *}, Н. Д. Алмазов², Е. М. Волков^{2, **}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

* e-mail: lenizn@yandex.ru

** e-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 02.03.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 01.06.2024 г.

Методом иммунофлуоресцентного мечения препаратов соматической мышцы дождевого червя показано присутствие в последних кальмодулина, Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 1 и типа 2, синаптотагмина типа 2 и типа 7 и кальциневрина А. Данные белки определяются как в синаптических, так и во внесинаптических регионах двигательной мышцы. Однако для синаптотагмина типа 2 и типа 7, кальциневрина А установлена их преимущественная локализация в зоне нервно-мышечных синапсов. При этом синаптическая локализация для синаптотагмина типа 7 и кальциневрина А выражена наиболее отчетливо.

Ключевые слова: Ca^{2+} -сенсорные белки, нервно-мышечный синапс, соматические мышечные клетки, дождевой червь

DOI: 10.31857/S0044452924040053, **EDN:** YQDYUI

ВВЕДЕНИЕ

Ca^{2+} -акцепторные белки участвуют в модуляции различных форм секреции медиатора и нейрональной пластичности как в центральных, так и периферических синапсах [1–7]. Фермент Ca^{2+} -кальмодулин зависимая протеинкиназа типа 2 широко представлен в зоне нервно-мышечных синапсов мышцы, прежде всего в месте расположения никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) постсинаптической мембраны [8–10]. Установлено, что данный фермент имеет самое непосредственное отношение к процессу рециклизации и инкорпорированию нАХР в мышечную мембрану [8, 11]. Также установлено, что различные изоформы Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ участвуют в нейрональной активности и синаптогенезе в NMDA-нейронах гиппокампа крысы [12], стимулируют рост нервных окончаний и новых нейрональных бутонов в нервно-мышечных синапсах мухи *Drosophila* [13]. Синаптотагмин типа 2 широко представлен в нервных терминалях ГАМКергических нейронов коры головного мозга мыши [14]. По-

следний является триггерным механизмом запуска быстрой секреции медиатора, в ответ на возбуждение [15]. Синаптотагмин типа 7 модулирует спонтанную активность в синапсах и вызывает депрессию постсинаптических токов в клетках Пуркинье мыши [16]. Известно, что фермент Ca^{2+} -кальмодулин зависимая протеинфосфатаза 3 состоит из двух субъединиц, каталитической — кальциневрин А и регуляторной — кальциневрин В [17, 18]. Кальциневрин А обладает широким спектром действия, включая: активацию секреции медиатора, стимуляцию нейрональной пластичности, регуляцию генетической экспрессии на уровне транскрипции [18]. В соматической мышце дождевого червя присутствуют два типа синапсов: холинергические [19] и ГАМКергические [20]. Иммунофлуоресцентная идентификация Ca^{2+} -акцепторных белков в двигательной нервно-мышечной системе аннелид ранее не проводилась. Таким образом, остается неясной и их роль в модуляции экзо-эндовезикулярного цикла секреции медиатора, а также предположительное участие в нейрональной пластичности периферической нервно-мышечной иннервации. Необходимо подчеркнуть, что представители типа

Сокращения: НМ — нАХР — никотиновые ацетилхолиновые рецепторы; ТМР- α -Б — тетраметилродамин- α -бунгаротоксин.

Annelida являются первыми животными в длинном филогенетическом ряду, у которых эволюционно сформировалась сложная система управления двигательной активностью соматической мускулатуры [21–24], что делает изучение подобных структур особенно актуальным. Таким образом, целью настоящего исследования стало иммунофлуоресцентное выявление и определение локализации ряда ключевых Ca^{2+} -сенсорных белков в двигательной мускулатуре аннелид на примере дождевого червя.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и приготовление препаратов. Для приготовления препарата, дождевой червь *Lumbricus terrestris* разрезался сбоку по всей длине, отрезались головной и хвостовой концы, раскрывался, удалялись внутренние органы и перегородки между сегментами [25]. Далее фрагменты кожно-мускульного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древес-Пакса (состав в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na_2SO_4 , 6 CaCl_2 , 2 Tris, 167 сахараза, pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Затем в течение 30 мин препараты фиксировали в 2% растворе *p*-формальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатно-солевом буфере (состав в мМ: 137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3 Na_2SO_4 , 1.4 KH_2PO_4 , pH 7.2). Мышцы последовательно инкубировали: 30 мин в 0.5% растворе Triton X-100; 15 мин в растворе, содержащем 5% козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% Triton X-100; 15 мин в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% Triton X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на основе фосфатно-солевого буфера.

Иммуномечение препаратов. Препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4°C в растворе А с моно- и поликлональными антителами. Использовали антитела к кальмодулину; ферментам Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназы 1 и 2 типов; синаптотагмину 2 и 7; кальциневрину А; синаптофизину (все в разведении 1 : 100). Антитела к Ca^{2+} -акцепторным белкам и синаптофизину были выработаны в разных хозяевах (мышь, кролик, коза), что позволяло проводить двойное иммуномечение исследуемых белков. Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами (ослиные против мыши, кролика или козы), конъюгированными с Alexa 488 или 647 (разведение 1 : 200) в растворе А. Для подтверждения специфичности связывания антител с соответствующими белками проводили контроль-

ные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля производили инкубацию препарата с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, на который вырабатывались первичные антитела. Отсутствие мечения антителами в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами. Мечение постсинаптических nAHP проводили с помощью тетраметилпродамин- α -бунгаротоксина (TMP- α -Б, 20 мкг/мл) в течение 50 мин. Всего в экспериментах по мечению антителами препаратов было использовано 48 образцов.

Микроскопия. После отмывки в фосфатно-солевом буфере, препараты помещали в раствор фосфатно-солевого буфера с глицерином (1 : 1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с использованием масляно-иммерсионного объектива $63\times/1.4$. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся Ar и He-Ne лазеры. Применяли следующие длины волн лазеров: для антител, меченных флуорофорами Alexa 488 — 488 нм, Alexa 647 — 633 нм; для меченного полипептида TMP- α -Б — 543 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (НИН, США; веб-сайт программы <https://imagej.net/ij/>).

Реактивы. Использовали следующие реактивы: формалин (#HT5011, Sigma-Aldrich, США); Tris (#9210-OP, Sigma-Aldrich); фосфатно-солевой буфер (#P4417, Sigma-Aldrich); Triton X-100 (#T8787, Sigma-Aldrich); нормальная ослиная сыворотка (#D9663, Sigma-Aldrich); бычий сывороточный альбумин (#BSAV-RO, Sigma-Aldrich); TMP- α -Б (#T0195, Sigma-Aldrich); глицерин (#G5516, Sigma-Aldrich); моноклональные мышинные антитела к кальмодулину (#ab2860, RRID:AB_303362, Abcam, Великобритания); поликлональные кроличьи антитела к Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназе 1 (#LS-C354567, LSBio, США); поликлональные кроличьи антитела к Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназе 2 (#MBS541139, MyBioSource, США); поликлональные козы к синаптотагмину 2 (#LS-C139718, RRID:AB_10943434, LSBio); поликлональные кроличьи к синаптотагмину 7 (#ab106618, Abcam); поликлональные кроличьи антитела к кальциневрину А (#ab137335, Abcam); антитела к синаптофизину поликлональные кроличьи (#ANR-013, RRID:AB_2341004, Alomone Labs, Израиль) и поликлональные козы (#sc-7569, RRID:AB_2199010, Santa Cruz Biotechnology,

США); иммуногенные пептиды, соответствующие моно- и поликлональным антителам; вторичные антитела ослиные против кролика конъюгированные с Alexa 488 (#A-21206, RRID:AB_2535792, Thermo Fisher Scientific, США); вторичные антитела ослиные против козы конъюгированные с Alexa 647 (#A-21447, RRID:AB_2535864, Thermo Fisher Scientific); вторичные антитела ослиные против мыши конъюгированные с Alexa 488 (#A-21202, RRID:AB_141607, Thermo Fisher Scientific).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Двигательные нервные окончания выявляли мечением антителами на синаптофизин — интегральный мембранный гликопротеин синаптических везикул [26, 27]. Маркирование нАХР постсинаптической мембраны проводилось окрашиванием TMP- α -Б [28].

Иммуногистохимическое мечение фрагментов соматической мускулатуры дождевого червя с целью обнаружения белка кальмодулина показало следующие результаты. Иммунофлуоресценция носит точечный характер, встречаясь по всей поверхности мембран соматических мышечных клеток (рис. 1a), сочетаясь с наличием ограниченных мест более интенсивного мечения (рис. 1a, стрелки). Необходимо отметить, что данные зоны частично перекрываются с районами свечения, маркированными на присутствие белка синаптофизина (рис. 1a, b, d, f) и с мечением TMP- α -Б нАХР (рис. 1a, c, e, f). Полученные данные позволяют считать, что белок кальмодулин присутствует как в синаптических, так и во внесинаптических зонах мембран соматических мышечных клеток и его локализация не демонстрирует выраженной привязки к районам нервно-мышечных контактов.

Выявление антителами наличия фермента Ca²⁺-кальмодулин зависимой протеинкиназы типа I показало неоднородное мечение всей поверхности

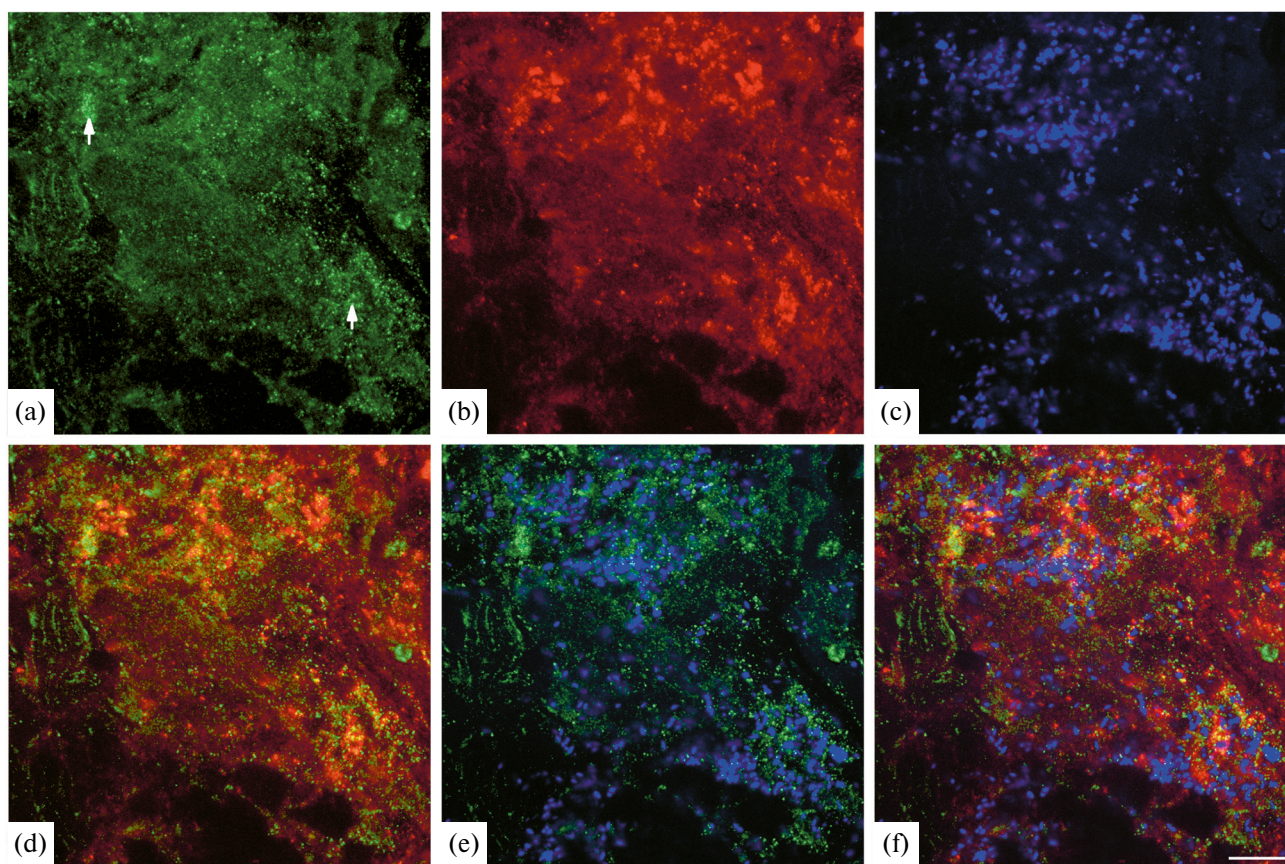


Рис. 1. Флуоресцентное тройное мечение препарата соматических мышечных клеток дождевого червя *Lumbricus terrestris*. (a) — Иммуномечение антителами к кальмодулину (зеленый цвет); стрелки указывают на места более интенсивного мечения; (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение TMP- α -Б постсинаптических нАХР (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20 μ m.

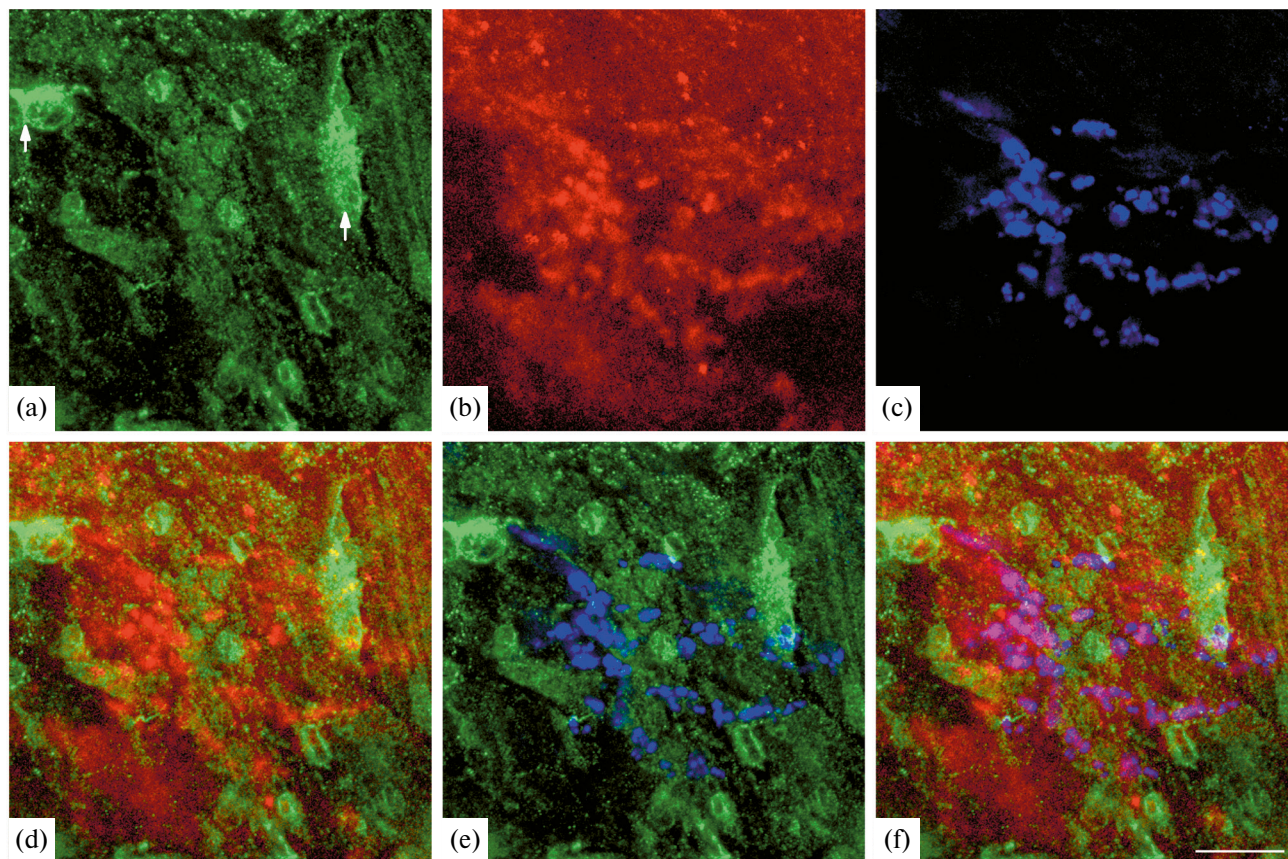


Рис. 2. Выявление Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 1 при флуоресцентном тройном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (a) — Иммуномечение антителами к Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназе типа 1 (зеленый цвет); стрелки указывают на места более интенсивного мечения; (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение TMR- α -Б постсинаптических нАХР (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20 μm .

мембран соматических мышечных клеток (рис. 2a), которое сочеталось с наличием ограниченных мест более интенсивного иммуномечения (рис. 2a, стрелки). При этом участки интенсивного мечения на данный фермент мало совпадали с мечением на синаптофизин (рис. 2a, b, d, f) и постсинаптические никотиновые нАХР (рис. 2a, c, e, f). Полученные результаты демонстрируют наличие в соматических мышечных клетках фермента Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы типа 1, причем последний присутствует в большей концентрации во внесинаптических зонах и, в меньшей, в синаптических.

Иммуногистохимическая реакция, поставленная с целью идентификации Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 2 показала неравномерную флуоресценцию мышечных клеток (рис. 3a). Иммуномечение на данный фермент практически полностью перекрывалось с зонами выявления белка синаптофизина (рис. 3a, b, d, f), а также постсинаптических нАХР (рис. 3a, c, e, f).

Таким образом, полученные результаты указывают на присутствие Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 2 как в синаптических, так и во внесинаптических регионах мышечной мембраны. Нельзя исключить, что данный фермент может присутствовать как в двигательных нервных окончаниях, так и в концевой пластинке постсинаптической мембраны, что может указывать на его предположительное участие в процессах рециклирования нАХР [8].

Иммуногистохимическое выявление мышечных препаратов с целью обнаружения белка синаптотагмина типа 2 показало неравномерное мечение мембран соматических мышечных клеток (рис. 4a). Необходимо отметить, что иммуномечение на синаптотагмин типа 2 полностью повторяло мечение на белок синаптофизин (рис. 4a, b, d, f) и постсинаптические нАХР (рис. 4a, c, e, f). Полученные данные позволяют считать с высокой вероятностью, что белок синаптотагмин 2 присутствует

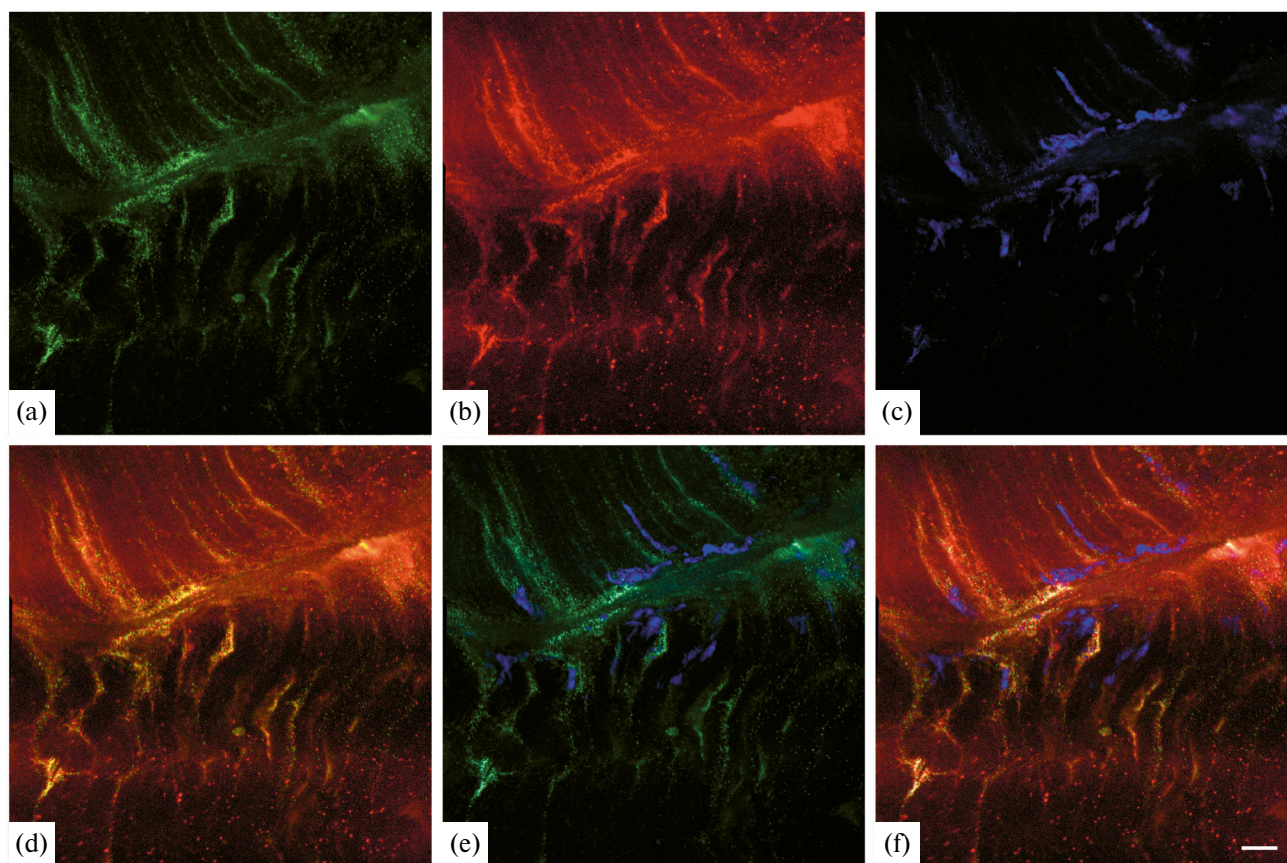


Рис. 3. Наличие Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 2 при тройном флуоресцентном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (a) — Иммуномечение антителами к Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназе типа 2 (зеленый цвет); (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение НАХР при помощи ТМР- α -Б (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20 μm .

как на пре-, так и на постсинаптических мембранах соматических мышечных клеток дождевого червя.

Мечение антителами мышечных препаратов на белок синаптотагмин типа 7 выявило неравномерное иммуномечение препарата, которое в некоторых участках имело более интенсивное свечение (рис. 5a, стрелки). Эти участки более яркого свечения совпадали с мечением на синаптофизин (рис. 5a, b, d, f) и НАХР (рис. 5a, c, e, f). Таким образом, синаптотагмин типа 7 в большей степени локализуется на пре- и постсинаптических мембранах мышечных клеток, и меньшей степени представлен вне зон нервно-мышечных синапсов.

Иммуногистохимическая реакция на определение белка кальциневрина А показала неравномерное мечение мышечных клетках (рис. 6a). При этом мечение антителами на белок кальциневрин А в большей степени повторяло маркирование на НАХР (рис. 6a, c, e, f), чем мечение на синаптофизин (рис. 6a, b, d, f). Полученные результаты позво-

ляют считать, что белок кальциневрин А в большей степени концентрируется в зоне нервно-мышечных синапсов. Более того, возможно он тесно связан с канально-рецепторной организацией концевых пластинок нервно-мышечных синапсов.

Подводя итог полученным результатам, можно прийти к следующему заключению. Методом иммунофлуоресцентного мечения препаратов соматической мышцы дождевого червя показано присутствие в последних ряда ключевых Ca^{2+} -акцепторных белков, а именно: кальмодулина, Ca^{2+} -кальмодулин зависимой протеинкиназы типа 1 и типа 2, синаптотагмина типа 2 и типа 7 и кальциневрина А. Некоторые из данных белков, такие как кальмодулин и Ca^{2+} -кальмодулин зависимая протеинкиназа типа 1 определяются как в синаптических, так и внесинаптических областях мышечных препаратов, без выраженной привязки своей локализации к зонам нервно-мышечных контактов. В тоже время такие белки как Ca^{2+} -кальмодулин зависимая протеинкиназа 2,

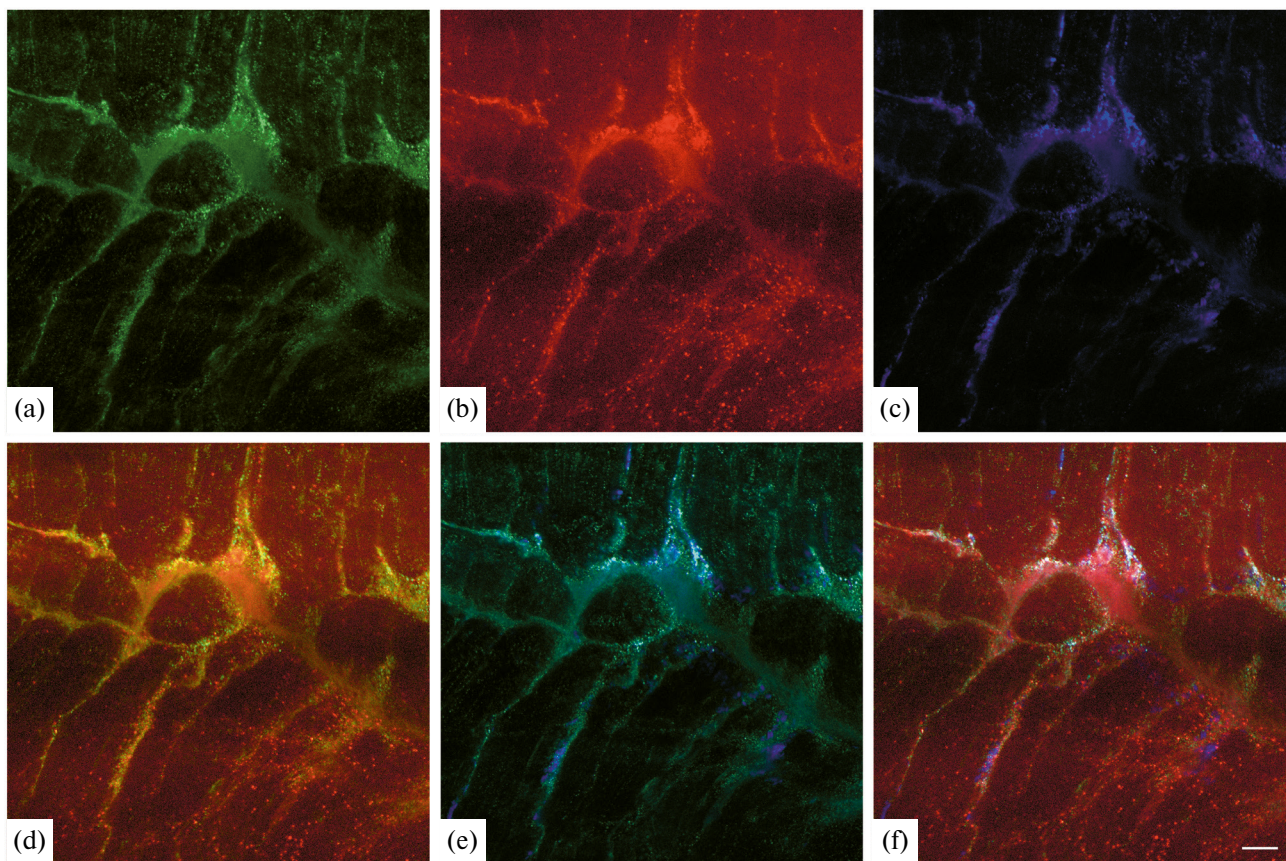


Рис. 4. Обнаружение синаптотагмина типа 2 при флуоресцентном тройном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (a) — Иммуномечение антителами к синаптотагмину 2 (зеленый цвет); (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение nAChR при помощи TMR-α-B (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20 μm .

синаптотагмин 2, синаптотагмин 7 и кальциневрин А хотя представлены и во внесинаптических регионах соматической мышцы, отчетливо демонстрируют свое присутствие именно в зонах концевых пластинок мионевральных синапсов. При этом для синаптотагмина типа 7 и кальциневрина А это присутствие выражено наиболее отчетливо. Основываясь на данных литературы [1, 11, 18] можно думать, что данные белки играют существенную роль как в процессах квантовой секреции медиатора, рециклировании постсинаптических канально-рецепторных комплексов, так и нейрональной пластичности двигательных нервно-мышечных синапсов.

Дождевой червь, который относится к типу Аннелиды, имеет характеристики свойственные для последнего общего предка билатеральных животных [29]. Кольчатые черви являются первыми целомическими сегментированными животными в филогенетическом ряду, которые обладают соматической мускулатурой и способны к сложным

управляемым локомоциям [23]. Нами получены сведения о наличии кальций-сенсорных белков в синапсах эволюционно-первичной двигательной мускулатуры. Аналогичные белки имеются в нервно-мышечном аппарате более высокоорганизованных животных, в том числе у различных классов типов Моллюски, Членистоногие и Хордовые, включая Млекопитающих [2–8]. Таким образом, можно утверждать, что система кальцевой регуляции квантовой секреции медиатора с помощью изученных нами кальций-акцепторных белков обладает высокой генетической консервативностью и сформировалась на самых ранних этапах эволюции нервно-мышечной регуляции двигательной активности у животных.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л.Ф.Н. и Е.М.В.), сбор данных (Н.Д.А.), обработка данных (Л.Ф.Н., Н.Д.А.), написание и редактирование манускрипта (Л.Ф.Н., Е.М.В.).

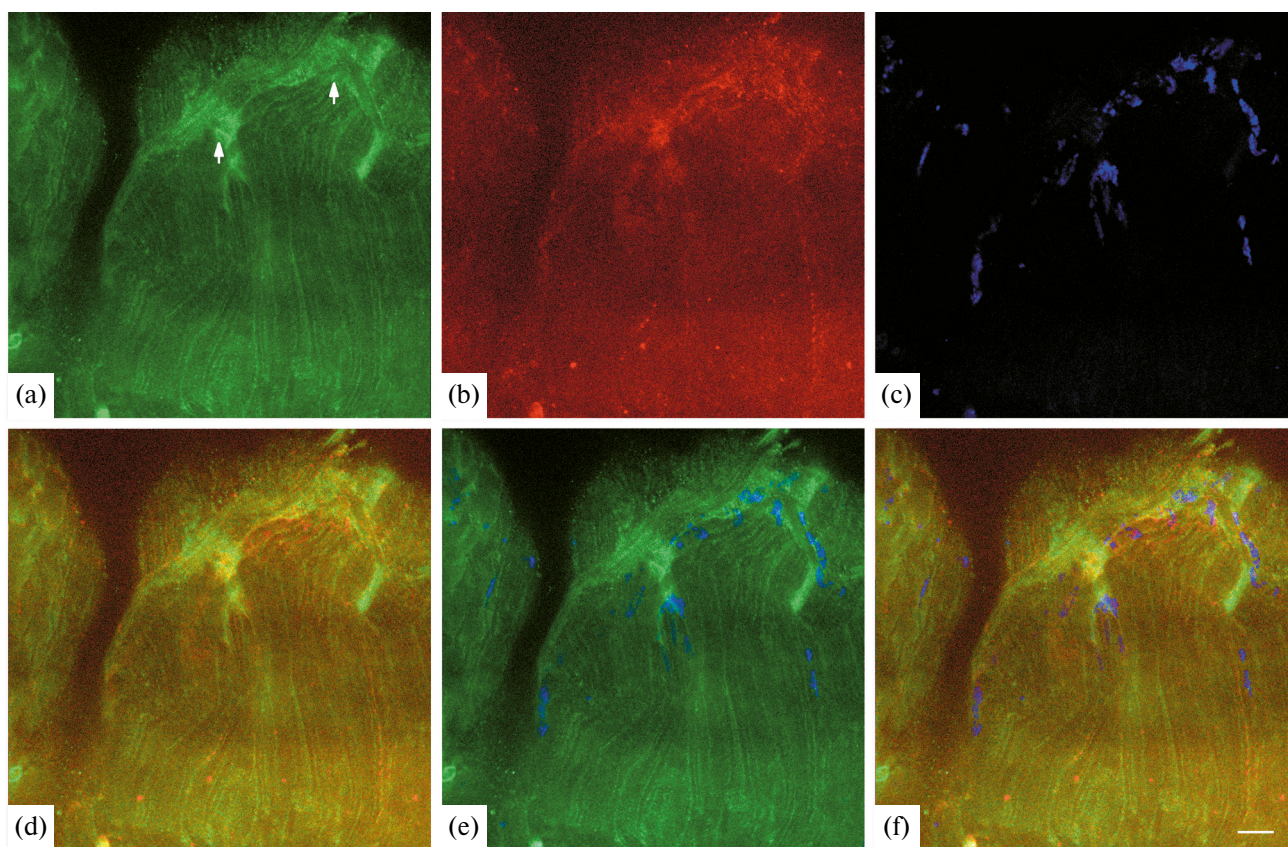


Рис. 5. Выявление синаптотагмина типа 7 при флуоресцентном тройном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (a) — Иммуномечение антителами к синаптотагмину 7 (зеленый цвет); стрелки указывают на места более интенсивного окрашивания; (b) — иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (c) — мечение nAChR при помощи TMR-α-B (синий цвет); (d) — наложение изображений (a) и (b); (e) — наложение изображений (a) и (c); (f) — наложение изображений (a), (b) и (c). Масштаб 20 μm .

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (протокол №23/5 от 12.05.2023 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 23-24-00239, <https://rscf.ru/project/23-24-00239/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Südhof TC* (2012) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011353. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011353>
2. *DeLorenzo RJ* (1982) Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Fed Proc* 41: 2265–2272.
3. *Xue R, Meng H, Yin J, Xia J, Hu Z, Liu H* (2021) The Role of Calmodulin vs. Synaptotagmin in Exocytosis. *Front Mol Neurosci* 14: 691363. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.691363>
4. *Sakaba T, Neher E* (2001) Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron* 32: 1119–1131. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00543-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00543-8)
5. *Liu Q, Chen B, Ge Q, Wang ZW* (2007) Presynaptic Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II modulates neurotransmitter release by activating BK channels at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *J Neurosci* 27: 10404–10413. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5634-06.2007>
6. *Fujii T, Sakurai A, Littleton JT, Yoshihara M* (2021) Synaptotagmin 7 switches short-term synaptic plasticity from depression to facilitation by suppressing synaptic transmission. *Sci Rep* 11: 4059. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83397-5>
7. *Pang ZP, Melicoff E, Padgett D, Liu Y, Teich AF, Dickey BF, Lin W, Adachi R, Südhof TC* (2006) Synaptotagmin-2 is essential for survival and contributes to Ca^{2+} triggering

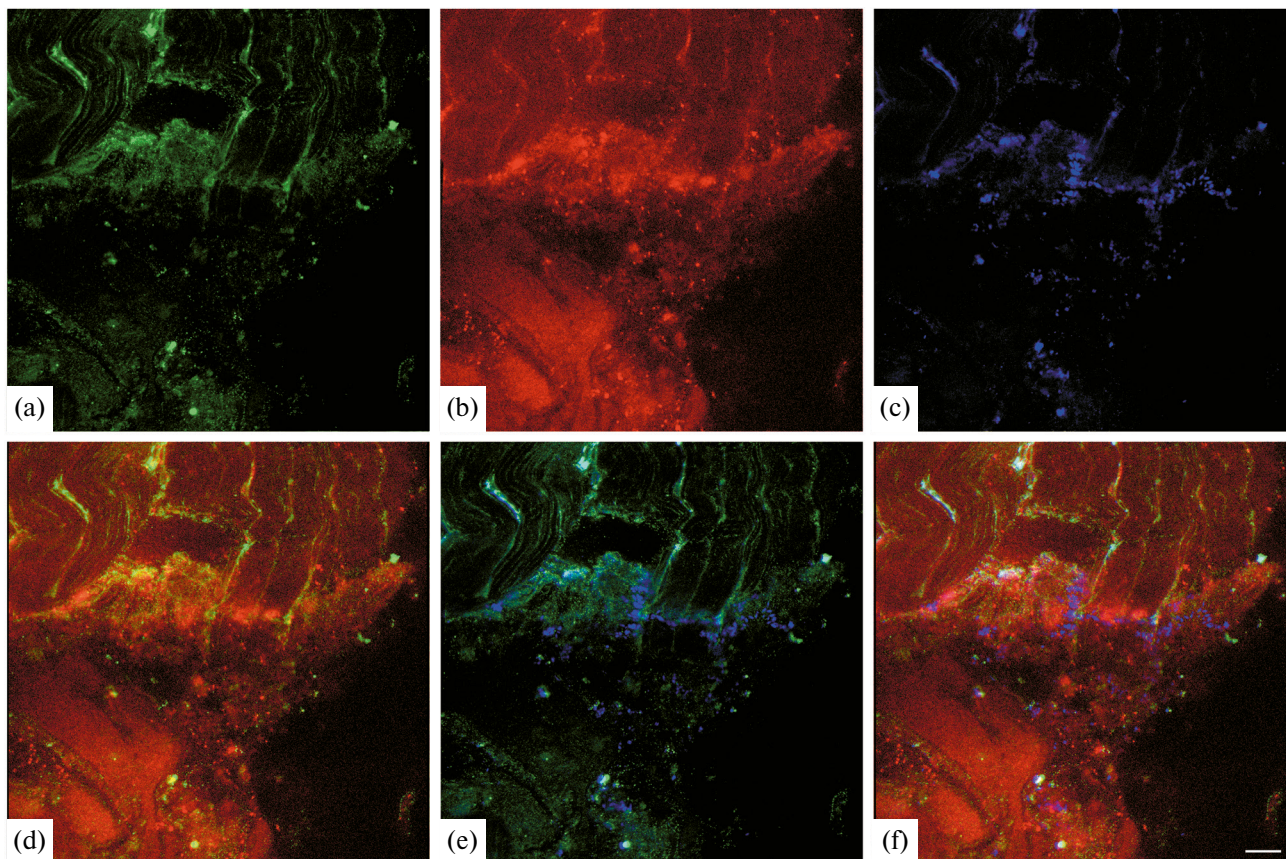


Рис. 6. Наличие кальцеврина А при флуоресцентном тройном мечении препарата соматических мышечных клеток дождевого червя. (а) – Иммуномечение антителами к кальцеврину А (зеленый цвет); (б) – иммуномечение антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (с) – мечение НАХР при помощи ТМР-α-Б (синий цвет); (d) – наложение изображений (а) и (b); (e) – наложение изображений (а) и (с); (f) – наложение изображений (а), (b) и (с). Масштаб 20 μm .

- of neurotransmitter release in central and neuromuscular synapses. *J Neurosci* 26: 13493–13504. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3519-06.2006>
8. *Martinez-Pena y Valenzuela I, Mouslim C, Akaaboune M* (2010) Calcium/calmodulin kinase II-dependent acetylcholine receptor cycling at the mammalian neuromuscular junction in vivo. *J Neurosci* 30: 12455–12465. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3309-10.2010>
 9. *Schworer CM, Rothblum LI, Thekkumkara TJ, Singer HA* (1993) Identification of novel isoforms of the delta subunit of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. Differential expression in rat brain and aorta. *J Biol Chem* 268: 14443–14449. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85259-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85259-6)
 10. *Bayer KU, Harbers K, Schulman H* (1998) αKAP is an anchoring protein for a novel CaM kinase II isoform in skeletal muscle. *EMBO J* 17: 5598–5605. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5598>
 11. *Martinez-Pena y Valenzuela I, Akaaboune M* (2021) The Metabolic Stability of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at the Neuromuscular Junction. *Cells* 10: 358. <https://doi.org/10.3390/cells10020358>
 12. *Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR* (2008) Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron* 57: 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.016>
 13. *Nesler KR, Starke EL, Boin NG, Ritz M, Barbee SA* (2016) Presynaptic CamKII regulates activity-dependent axon terminal growth. *Mol Cell Neurosci* 76: 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.08.007>
 14. *Chen C, Arai I, Satterfield R, Young SM Jr, Jonas P* (2017) Synaptotagmin 2 Is the Fast Ca^{2+} Sensor at a Central Inhibitory Synapse. *Cell Rep* 18: 723–736. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.067>
 15. *Xu J, Mashimo T, Südhof TC* (2007) Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca^{2+} sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* 54: 567–581. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.004>
 16. *Weyrer C, Turecek J, Harrison B, Regehr WG* (2021) Introduction of synaptotagmin 7 promotes facilitation at the climbing fiber to Purkinje cell synapse. *Cell Rep* 36: 109719. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109719>
 17. *Yakel JL* (1997) Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and

- gene transcription. *Trends Pharmacol Sci* 18: 124–134. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(97\)01046-8](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(97)01046-8)
18. Creamer TP (2020) Calcineurin. *Cell Commun Signal* 18: 137. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00636-4>
 19. Volkov EM, Nurullin LF (2005) Effects of cholinergic receptor agonists and antagonists on miniature stimulatory postsynaptic ionic currents in somatic muscle cells of *Lumbricus terrestris*. *Bull Exp Biol Med* 139: 360–362. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0294-2>
 20. Nurullin LF, Almazov ND, Volkov EM (2023) Immunofluorescent Identification of GABAergic Structures in the Somatic Muscle of the Earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 17: 208–213. <https://doi.org/10.1134/S1990747823040074>
 21. Parry L, Tanner A, Vinther J (2014) The origin of annelids. *Front Palaeontology* 57: 1091–1103. <https://doi.org/10.1111/pala.12129>
 22. Purschke G, Müller MCM (2006) Evolution of body wall musculature. *Integr Comp Biol* 46: 497–507. <https://doi.org/10.1093/icb/icj053>
 23. Allentoft-Larsen MC, Gonzalez BC, Daniels J, Katija K, Osborn K, Worsaae K (2021) Muscular adaptations in swimming scale worms (Polynoidae, Annelida). *R Soc Open Sci* 8: 210541. <https://doi.org/10.1098/rsos.210541>
 24. Denes AS, Jékely G, Steinmetz PR, Raible F, Snyman H, Prud'homme B, Ferrier DE, Balavoine G, Arendt D (2007) Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* 129: 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.040>
 25. Volkov EM, Nurullin LF, Nikolsky EE, Švandová I, Vyskočil F (2000) Participation of electrogenic Na⁺-K⁺-ATPase in the membrane potential of earthworm body wall muscles. *Physiol Res* 49: 481–484. http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/49/49_481.pdf
 26. Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004) Synaptophysin: Leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26: 445–453. <https://doi.org/10.1002/bies.20012>
 27. Kwon SE, Chapman ER (2011) Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* 70: 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.001>
 28. Krause M, Wernig A (1985) The distribution of acetylcholine receptors in the normal and denervated neuromuscular junction of the frog. *J Neurocytol* 14: 765–780. <https://doi.org/10.1007/bf01170827>
 29. Christodoulou F, Raible F, Tomer R, Simakov O, Trachana K, Klaus S, Snyman H, Hannon GJ, Bork P, Arendt D (2010) Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature* 463: 1084–1088. <https://doi.org/10.1038/nature08744>

IMMUNOFLUORESCENT LOCALIZATION OF CA²⁺-SENSOR PROTEINS IN THE SOMATIC MOTOR MUSCLES OF THE EARTHWORM *LUMBRICUS TERRESTRIS*

L. F. Nurullin^{a, b, #}, N. D. Almazov^b and E. M. Volkov^{b, ##}

^a Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russia

^b Kazan State Medical University, Kazan, Russia

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

^{##} e-mail: euroworm@mail.ru

The method of immunofluorescent staining of earthworm somatic muscle samples showed the presence of calmodulin, Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases type 1 and type 2, synaptotagmin type 2 and type 7 and calcineurin A. These proteins are detected in both synaptic and extrasynaptic regions of the motor muscle. However, for synaptotagmin type 2 and type 7, calcineurin A, their predominant localization in the area of neuromuscular synapses has been established. Besides, synaptic localization for synaptotagmin 7 and calcineurin A is most clearly expressed.

Keywords: Ca²⁺-sensor proteins, neuromuscular junction, somatic muscle cells, earthworm

ВЛИЯНИЕ АПАМИНА НА ПРОФИЛИ ВНЕКЛЕТОЧНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ СУБЭПИКАРДА В МОДЕЛИ ИНФАРКТА МИОКАРДА У КРЫС

© 2024 г. А. В. Степанов¹, *, М. Г. Добрецов¹, Ю. А. Филиппов¹, И. В. Кубасов¹

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

*e-mail: botanik2407@gmail.com

Поступила в редакцию 08.04.2024 г.

После доработки 23.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Роль Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов низкой проводимости (SK) в патогенезе кардиомиопатий различной этиологии остается малоизученной. Целью данной работы было оценить влияние блокатора этих каналов апамина на электрогенез внеклеточно регистрируемых потенциалов действия (ВПД) субэпикардиальных миоцитов левого желудочка изолированных сердец ложнопериоперированных крыс и крыс с инфарктом миокарда, вызванным ишемией-реперфузией. Было установлено, что локальная доставка в зону регистрации ВПД блокатора SK-каналов апамина в концентрации 500 нМ не влияла на профили ВПД в группе ложнопериоперированных крыс, но вызывала существенное замедление времени реполяризации и снижение фазы следовой гиперполяризации ВПД в группе крыс с инфарктом миокарда. Полученные данные предполагают о том, что указанные изменения в электрогенезе ВПД после инфаркта могут быть связаны с усилением экспрессии и/или активности SK-каналов в субэпикардиальных миоцитах. Обсуждается возможная роль этих каналов в структурно-функциональном ремоделировании миокарда левого желудочка сердца после ишемии-реперфузии.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, кардиомиоциты, внеклеточный потенциал действия, апамин, SK-каналы

DOI: 10.31857/S0044452924040065, **EDN:** YQCPFG

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что ассоциированное с инфарктом миокарда (ИМ) и ишемией увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} происходит вследствие утечки ионов Ca^{2+} из дисфункционального саркоплазматического ретикулума и притока внеклеточного Ca^{2+} [1–4]. Выраженное повышение содержания внутриклеточного Ca^{2+} может инициировать обширную активацию K^{+} -тока через SK-каналы (Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы низкой проводимости), приводящую к сокращению продолжительности ПД и эффективного рефрактерного периода. Сокращение длительности ПД и гетерогенность реполяризации являются хорошо известными факторами, способствующими развитию аритмий, что указывает на значимость тока через

SK-каналы (I_{SK}) при желудочковых аритмиях, вызванных ИМ [1].

Известно, что SK-каналы экспрессируются во многих тканях, в том числе в сердце. В кардиомиоцитах предсердий эти каналы представлены в значительном количестве [5–7], тогда как в желудочках SK-каналы представлены незначительно или вообще отсутствуют [8–10]. Однако при кардиомиопатиях различной этиологии у человека и в различных животных моделях (хроническая сердечная недостаточность (ХСН) [11, 12], инфаркт миокарда (ИМ) [13, 14], диабетическая кардиомиопатия [15]) наблюдается повышение вклада SK-каналов в реполяризацию желудочков. Кардиомиоциты экспрессируют SK1-, SK2- и SK3-изоформы SK-каналов [5], и все эти три изоформы блокируются апамином, являющимся их селективным блокатором [16, 17]. Было показано, что применение апамина для блокирования SK-каналов предотвращало и подавляло предсердную [18] и желудочковую фибрилляцию [10] на разных животных моделях, что подтверждает участие I_{SK} в развитии аритмий в патологических условиях. В то же время есть работы, в которых применение апамина в модели сердечной недостаточ-

Сокращения: ИМ — инфаркт миокарда; ИР — ишемия-реперфузия; ВПД — внеклеточный потенциал действия; ЛО — ложнопериоперированные; ЛЖ — левый желудочек; I_{SK} — ток через SK-каналы; СГ — следовая гиперполяризация; ХСН — хроническая сердечная недостаточность; РТ — раствор Тироде; BDM — 2,3-бутандион моноксим; РТА — раствор Тироде с апамином; следовая деполяризации.

ности демонстрировало проаритмическое действие, нарушая реполяризацию, что приводило к развитию ранней постдеполяризации. Это может указывать на то, что апамин-чувствительный K^+ -ток при ХСН поддерживает реполяризационный резерв кардиомиоцитов и предотвращает развитие полиморфной желудочковой тахикардии по типу “пируэт” (*torsades de pointes*) [19].

В наших недавних исследованиях с использованием метода внеклеточной регистрации ПД с использованием стеклянных электродов с тонким (наружный диаметр примерно 5 мкм) кончиком [20] было обнаружено, что после ИМ, вызванного ишемией-реперфузией (ИР) левого желудочка (ЛЖ) сердца крысы, наблюдаются изменения профилей внеклеточно регистрируемых ПД (вПД) субэпикардиальных кардиомиоцитов, заключающиеся в формировании сопровождающих их фазы следовой гиперполяризации (СГ). Было выдвинуто предположение, что фаза СГ может быть обусловлена появлением дополнительного входящего тока через SK-каналы. С целью проверки данной гипотезы с использованием этого же метода было проведено исследование влияния блокатора SK-каналов апамина на профили вПД желудочковых кардиомиоцитов при ИМ и вкладе этих каналов в реполяризацию и СГ. Поскольку данная методика позволяет осуществлять регистрацию вПД от различных компартментов клеточной мембраны субэпикардиальных кардиомиоцитов (участки, включающие выходы t-трубочек и свободные от них), другой целью было определить локализацию этих каналов в соответствующих мембранных компартментах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнялись на сердцах лабораторных крыс-самцов линии Wistar (возраст и вес на начало эксперимента 3–4 месяца и 250–300 г соответственно). Во время эксперимента животные содержались в виварии ИЭФБ РАН в стандартных условиях и при свободном доступе к воде и пище. Всего в исследовании было использовано 36 животных: 15 ложнооперированных крыс (ЛО-группа) и 21 крыса с ишемией и реперфузией (ИР-группа). Из 15 крыс ЛО-группы у всех животных производилась регистрация ЭКГ; 5 крыс были взяты на электрофизиологические исследования с последующим планиметрическим анализом для подтверждения отсутствия зон некроза. Из 21 крысы ИР-группы у всех животных была произведена регистрация ЭКГ; 17 крыс были использованы в планиметрическом исследовании для оценки доли рубцовой ткани; из них 5 крыс предварительно были взяты на электрофизиологические эксперименты.

В качестве модели ИМ применялась модель ИР. Коронароокклюзия с последующей реперфузией (ИР-группа) выполнялась на животных, нар-

котизированных с помощью золетила (40 мг/кг веса животного; Virbac, Франция) с добавлением ксиланита (10 мг/кг веса животного; Нита-Фарм, Россия) в соответствии с ранее описанной методикой [21]. В группе ИР-крыс лигатуру снимали через 45 мин после окклюзии левой коронарной артерии. У животных ЛО-группы лигатура вокруг артерии размещалась в точности, как и в случае с ИР, но без окклюзии артерии. Для проведения искусственной вентиляции легких с помощью аппарата ИВЛ (Kent Scientific TOPOTM Dual Mode Ventilator, США; частота дыхания — 60/мин, дыхательный объем в пределах от 1.5 до 3 мл/100 г массы) проводилась интубация трахеи с предварительной обработкой гортани 2 % раствором лидокаина. Окклюзия артерии подтверждалась подъемом сегмента ST на ЭКГ [22].

ЭКГ-исследование проводилось на крысах, обезбоженных с помощью ингаляции изофлурана (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) через маску. Данный тип наркоза был выбран в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями для проведения ЭКГ-исследований на крысах [23]. Регистрация ЭКГ осуществлялась в трёх стандартных отведениях с использованием подкожных игольчатых электродов, подключённых к электрокардиографу Поли-Спектр — 8/В (Россия). Во время регистрации ЭКГ животных размещали на подогреваемом столике (38 °С). Регистрация кардиограмм осуществлялась во время операции для определения качества наложения лигатуры и подтверждения развития ишемии и через 4 недели после операции. Длительность регистрации составляла 5 мин, а усреднённые параметры ЭКГ рассчитывались с использованием программы, разработанной в нашей лаборатории в среде MatLab. В полученных для каждого животного записях ЭКГ осуществлялось усреднение PQRST комплексов для более точной оценки исследуемых параметров (амплитуды основных зубцов и длительности интервалов).

Через 4 недели после операции наркотизированные золетилем и ксилазином (см. выше) крысы ЛО- и ИР-групп вывелись из эксперимента; сердца извлекались для проведения электрофизиологических экспериментов и оценки размера рубца после ИР.

Для оценки размера ИМ сердце разрезали на 5–6 поперечных срезов, которые после окраски трифенилтетразолием хлористым (1 % раствор трифенилтетразолия хлористого в 0.2 М Tris, pH 7.8) в соответствии с ранее описанной методикой [24] визуализировались под цифровым USB-микроскопом со штативом (модель МИКМЕД 5.0, Россия). Аналогичным образом исследовались сердца крыс ЛО-группы. Анализ полученных изображений проводился планиметрическим методом при помощи программы Fiji — ImageJ. Доля рубцовой ткани миокарда ЛЖ определялась как отношение площади

рубцовой ткани к общей площади стенок ЛЖ для каждого поперечного среза. Затем производился расчёт среднего значения для всего сердца.

Электрофизиологические исследования проводились на изолированных сердцах ЛО- и ИР-крыс в условиях сохраненного синусового ритма при постоянной перфузии сердца аэрируемым физиологическим раствором по методу Лангендорфа: сердце извлекалось и помещалось на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой для микроэлектродной регистрации [25]. Перфузионный раствор представлял собой аэрированный карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2) раствор Тироде со следующим составом: 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 5.6 mM глюкозы, pH 7.4. Эксперименты проводили с подогревом перфузирующего раствора до 36–37°C. Скорость перфузии составляла 5–7 мл/мин. Удаление из экспериментальной камеры избыточного раствора осуществляли через силиконовую трубочку диаметром 1 мм, подключенную к аспиратору. Изготовление микроэлектродов (патч-пипеток) с диаметром кончика 5 мкм производили с использованием программируемого пуллера (Sutter Instr., Model P-1000, США) из трубочек боросиликатного стекла с наружным диаметром 1.5 мм и внутренним диаметром 0.86 мм. После этого микроэлектрод заполняли раствором Тироде (РТ) или раствором Тироде с добавлением блокатора SK-каналов апамина (Tocris, США) в концентрации 500 нМ (РТА). Сопротивление заполненного РТ микроэлектрода составляло около 2 МОм. Сократительная активность сердца блокировалась добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФ-азы 2,3-бутандион монооксида (BDM, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 30 mM. Микроэлектрод, заполненный РТ или РТА и подключенный к входу усилителя АМ-1500 (National Instruments, США), подводили к произвольно выбранным участкам поверхности ЛЖ исследуемых сердец ЛО- и ИР-групп крыс при помощи микроманипулятора Sensapex (Финляндия). При образовании устойчивого контакта кончика микроэлектрода на выбранном участке поверхности ЛЖ сердца нами регистрировались авторитмические систолические вПД субэпикардальных миоцитов с частотой в диапазоне 0.3 — 1 Гц. Как было нами ранее показано, при использовании микроэлектрода с тонким кончиком, свыше 80% случайным образом регистрируемых ответов от субэпикарда ЛЖ относятся к вПД2 (два негативных пика, позиция кончика электрода в зоне кардиомиоцита, содержащей один или более выходов t-трубочек на поверхность клетки) [25]. Поэтому для регистрации достаточного для статистической обработки количества вПД1 (один негативный пик, кончик микроэлектрода находится в районе мембраны клетки, не содержащей выходов t-трубочек на поверхность) осуществлял-

ся целенаправленный поиск именно таких ответов путем последовательного смещения (10–15 мкм) кончика микроэлектрода в соседние участки миоцитов субэпикарда до появления соответствующего ответа. При этом выбор мест регистрации вПД в сердцах ИР-группы определялся как в субэпикарде над зоной вероятного интрамурального инфаркта (ниже места перетяжки коронарной артерии), так и вне этой зоны. В среднем в каждом эксперименте выполнялось непрерывная 30-минутная регистрация 2–3 вПД1 или вПД2. После этого происходила замена микропипетки на микропипетку, заполненную альтернативным раствором, и последующая регистрация вПД по тому же алгоритму. Регистрируемые сигналы оцифровывались с частотой 10 кГц при помощи аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments, США) и анализировались с помощью программного пакета WinWCP 5 (SIPBS, Великобритания). Все данные проверяли на нормальность распределения (тест Шапиро–Уилка) и, в соответствии с результатами этой проверки, различия между значениями в ЛО- и ИР-группах оценивали как достоверные при $p < 0.05$, используя соответствующий параметрический или непараметрический тест. Представленные в тексте данные приведены в виде средних значений величин с их стандартными ошибками.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрокардиографические исследования. Регистрация ЭКГ осуществлялась во время операции для определения точности наложения лигатуры: острая ишемия сопровождалась подъёмом ST-сегмента. Анализ записей II стандартного отведения ЭКГ крыс через 4 недели после операции в ИР-группе показал характерные достоверные изменения ряда амплитудных параметров по сравнению с крысами ЛО-группы, а именно снижение амплитуды S и T зубцов (рис. 1). Достоверных отличий амплитуды других зубцов показано не было. Также не было показано изменения длительности интервалов RR, QT и QTc в группе ИР-крыс по сравнению с крысами ЛО-группы.

Оценка размера инфарктной зоны. У крыс ИР-группы после извлечения сердца и помещения в экспериментальную камеру зона инфаркта отчетливо визуализировалась в виде светлой области ниже области лигирования. Доля рубцовой ткани, рассчитанная на основе анализа поперечных срезов стенки ЛЖ, варьировала в диапазоне от 5% до 35% при среднем значении $15.6 \pm 2.6\%$ (17 крыс). При этом зона рубца, как правило, не затрагивала субэпикардальные миоциты, от которых осуществлялось отведение вПД (рис. 2b), что согласуется с данными о том, что непродолжительная ишемия (< 45 мин) сопровождается минимальной гибелью клеток субэпикарда [26, 27].

В сердцах крыс ЛО-группы (5 крыс), использовавшихся в электрофизиологических экспериментах, зоны некроза на срезах выявлены не были, что позволяет говорить об отсутствии дополнительного, повреждающего миокард воздействия в период проведения электрофизиологических экспериментов на изолированном сердце (рис. 2а).

Электрофизиологические исследования: изменение профилей вПД после ИР. В электрофизиологических экспериментах были исследованы изолированные сердца крыс ЛО- и ИР-групп (по 5 крыс в каждой группе). Регистрация ответов осуществлялась с использованием микроэлектродов, заполненных РТ. На рис. 3 представлены примеры индивидуальных вПД1 и вПД2 субэпикардиальных кардиомиоцитов ЛЖ. Как отмечалось ранее (см. Материалы и методы), профили вПД кардиомиоцитов ЛЖ сердца ЛО- (рис. 3а) и ИР-крыс (рис. 3б) представляли собой сигналы двух типов. Профили внеклеточных ответов, регистрируемые в ЛО- и ИР-группах, существенно различались между собой по времени реполяризации T_{90} (время спада на 90% до базовой

линии): T_{90} вПД1 ИР-крыс было выше такового параметра в сердцах ЛО-крыс (12.2 ± 1.04 мс и 5.4 ± 0.5 мс соответственно; более 100 регистраций в каждом из 5 сердец в каждой группе), тогда как T_{90} вПД2 в сердцах ИР-группы было ниже соответствующего значения в группе ЛО-животных (29.3 ± 1.5 мс и 46.7 ± 3.2 мс соответственно; более 100 регистраций в каждом из 5 сердец в каждой группе). Также вПД1 и вПД2 у крыс ИР-группы сопровождалась выраженной позитивной фазой СГ. При этом указанные различия сохранялись вне зависимости от места регистрации ответов относительно зоны инфаркта.

Электрофизиологические эксперименты: изменения профилей вПД ЛО- и ИР-крыс при локальной доставке апамина. Как показано на рис. 4, в ЛО-группе после формирования контакта кончика микропипетки, заполненной РТА, не наблюдалось достоверных изменений профилей вПД как 1-го, так и 2-го типа на протяжении 30-минутной непрерывной регистрации ($p > 0.05$).

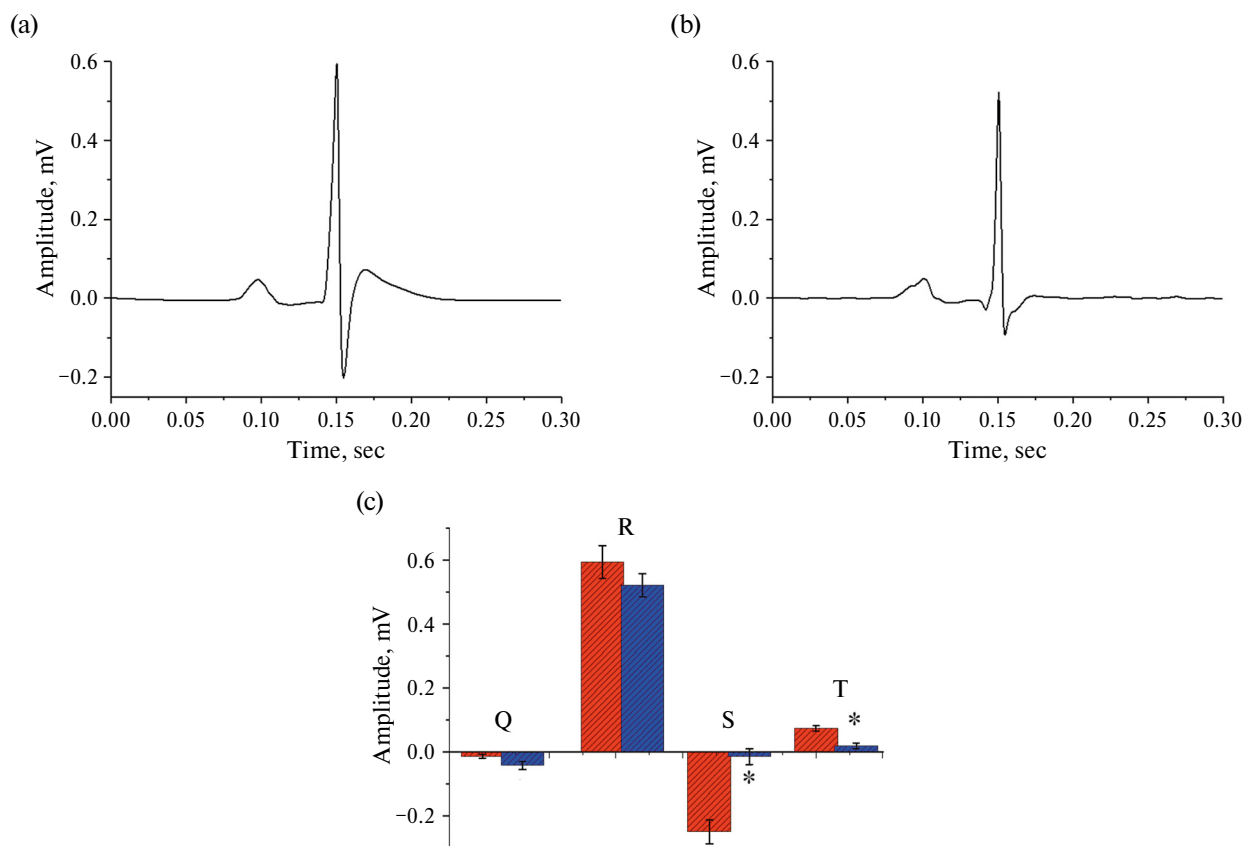


Рис. 1. Усредненные QRS-T-комплексы ЛО- (а) и ИР-крыс (б) во II стандартном отведении и средние значения амплитуд зубцов Q, R, S, T (с) по всей выборке через 4 недели после операции (красные столбцы – ЛО-группа (15 крыс); синие столбцы – ИР-группа (21 крыса).

(* – достоверное отличие от ЛО-группы, $p < 0.05$. Для зубцов Q, S и T – U-критерий Манна – Уитни; для зубца R – t-критерий Стьюдента).

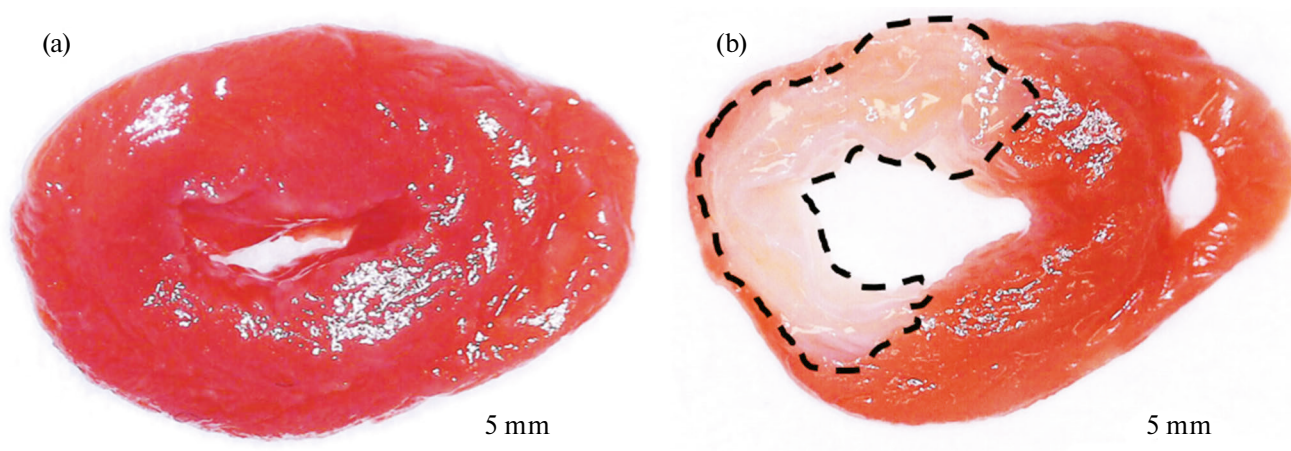


Рис. 2. Срезы сердец ЛО- (а) и ИР-крыс (b), окрашенные раствором трифенилтетразолия хлористого. Пунктиром обозначены границы рубцовой ткани.

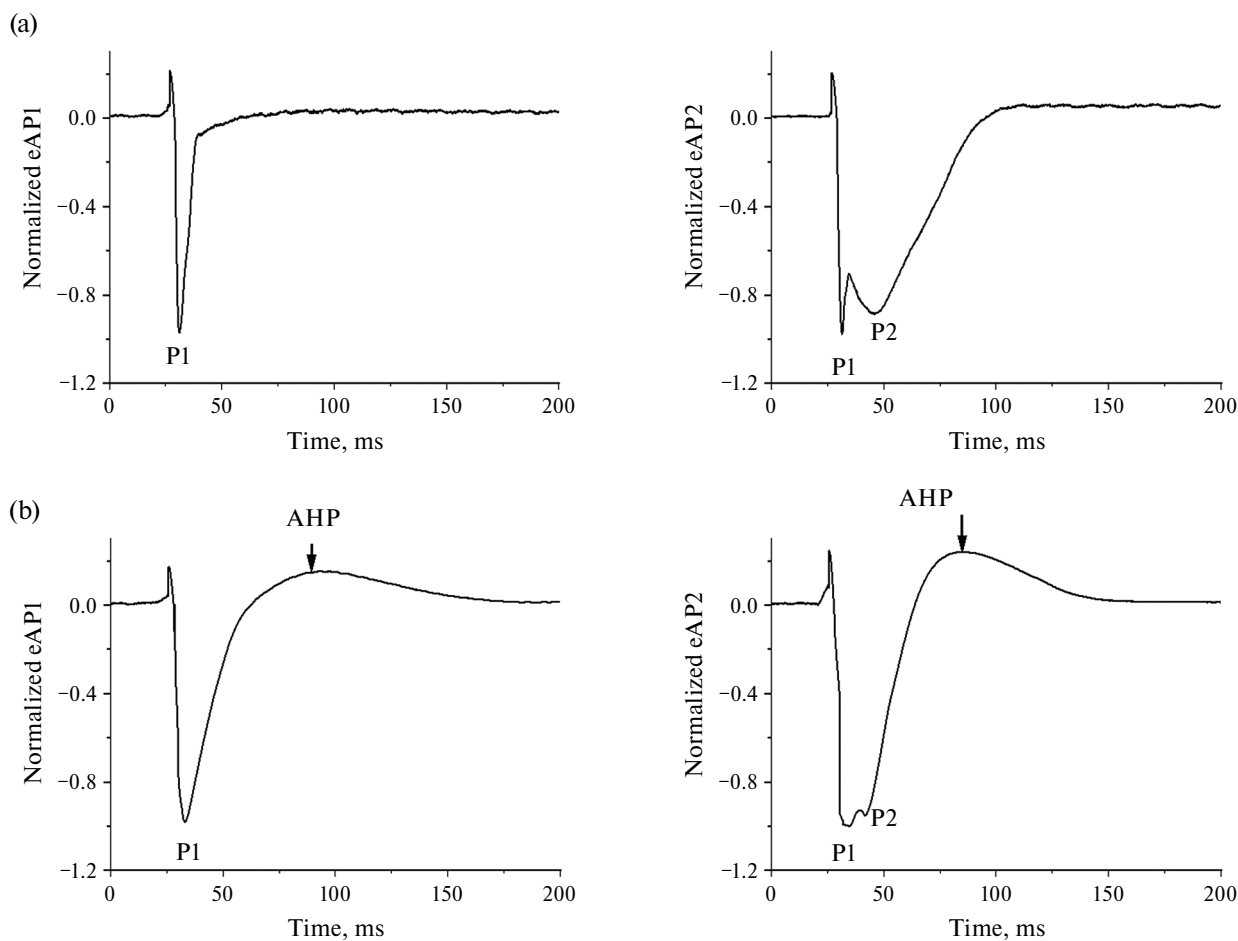


Рис. 3. Репрезентативные примеры профилей вПД1 (eAP1) и вПД2 (eAP2) субэпикарда ЛЖ крыс ЛО- (а) и ИР-групп (b). Все ответы нормализованы к величине их первого и единственного для вПД1 негативного пика (P1); P2 – отметка второго негативного пика в составе вПД2. Стрелками отмечена фаза СГ (afterhyperpolarization, ANP).

Однако, как показано на рис. 5, в ИР-группе к 30-й минуте после формирования контакта кончика микропипетки, заполненной РТА, наблюдалось подавление фазы СГ у вПД1 и вПД2 и увеличение

их T_{90} . Одновременно у вПД2 наблюдалось формирование повторных негативных пиков постдеполяризация (afterdepolarization, AD), формирующихся как на спаде, так и после окончания вПД2.

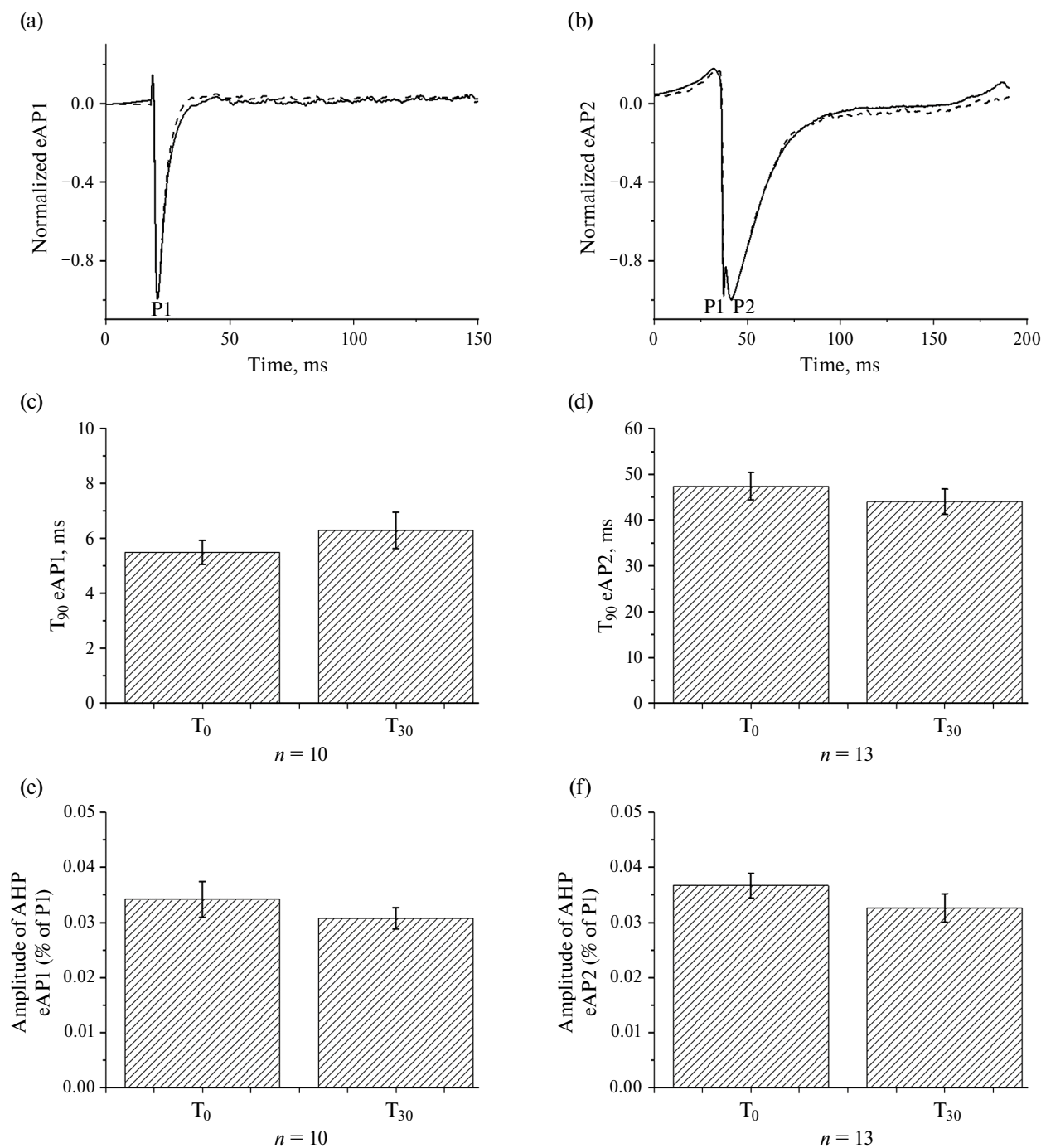


Рис. 4. Апамин не влияет на спад ВПД 1-го и 2-го типа эпикардиальных миоцитов ЛЖ сердца ЛО-крыс.

(a), (b) – репрезентативные примеры ВПД1 (eAP1) и ВПД2 (eAP2) соответственно в начале (сплошная линия) и через 30 минут (пунктирная линия) после контакта кончика микропипетки, заполненной РТА. P1 и P2 – отметка пиков в составе профилей ВПД.

(c), (d) – средние значения T₉₀ ВПД1 (eAP1) и ВПД2 (eAP2) соответственно в начале (T₀) и через 30 минут (T₃₀) непрерывной регистрации (парный t-критерий Стьюдента, $p > 0.05$).

(e), (f) – средние значения амплитуды СГ (АНР) ВПД1 (eAP1) и ВПД2 (eAP2) соответственно, нормированные к первому негативному пику P1, в начале (T₀) и через 30 мин (T₃₀) непрерывной регистрации (T-критерий Вилкоксона для связанных выборок, $p > 0.05$).

(n – число регистраций в группе из 5 животных).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в представленных исследованиях данные ЭКГ (достоверное снижение амплитуды S- и T-зубцов) и данные планиметрического анализа поперечных срезов сердца подтверждают ранее опубликованные нами результаты по развитию ИМ в модели ИР [20]. Как в вышеуказанной, так и в данной работе для регистрации вПД мы использовали электроды с тонким кончиком (наружный диаметр 5 мкм). В отличие от традиционной внутриклеточной регистрации или внеклеточной регистрации сигналов электродами с большим диаметром кончика, этот метод позволяет осуществлять регистрацию вПД от разных мембранных компартов индивидуальных кардиомиоцитов. С помощью данного метода было показано, что ИМ у крыс сопровождается разнонаправленными изме-

нениями вПД1, отражающих активность ионных токов через наружную плазматическую мембрану, и вПД2, отражающих активность ионных токов мембраны Т-системы кардиомиоцитов. А именно, у вПД1 время реполяризации (T_{90}) по сравнению с ЛО-крысами увеличивалось, тогда как вПД2 демонстрировали ее существенное укорочение. Скорость реполяризации кардиомиоцитов является одним из критических параметров для поддержания нормальной сердечной активности и определяется во многом активностью K^+ -каналов “реполяризационного” резерва. Основными реполяризующими токами в миокарде взрослых крыс являются I_{to} (transient outward K^+ current) и I_{kur} (ultrarapid delayed rectifier current) [28, 29]. Показано, что при инфаркте миокарда происходит значительное снижение I_{to} [30], что может приводить к удлинению ПД. Уве-

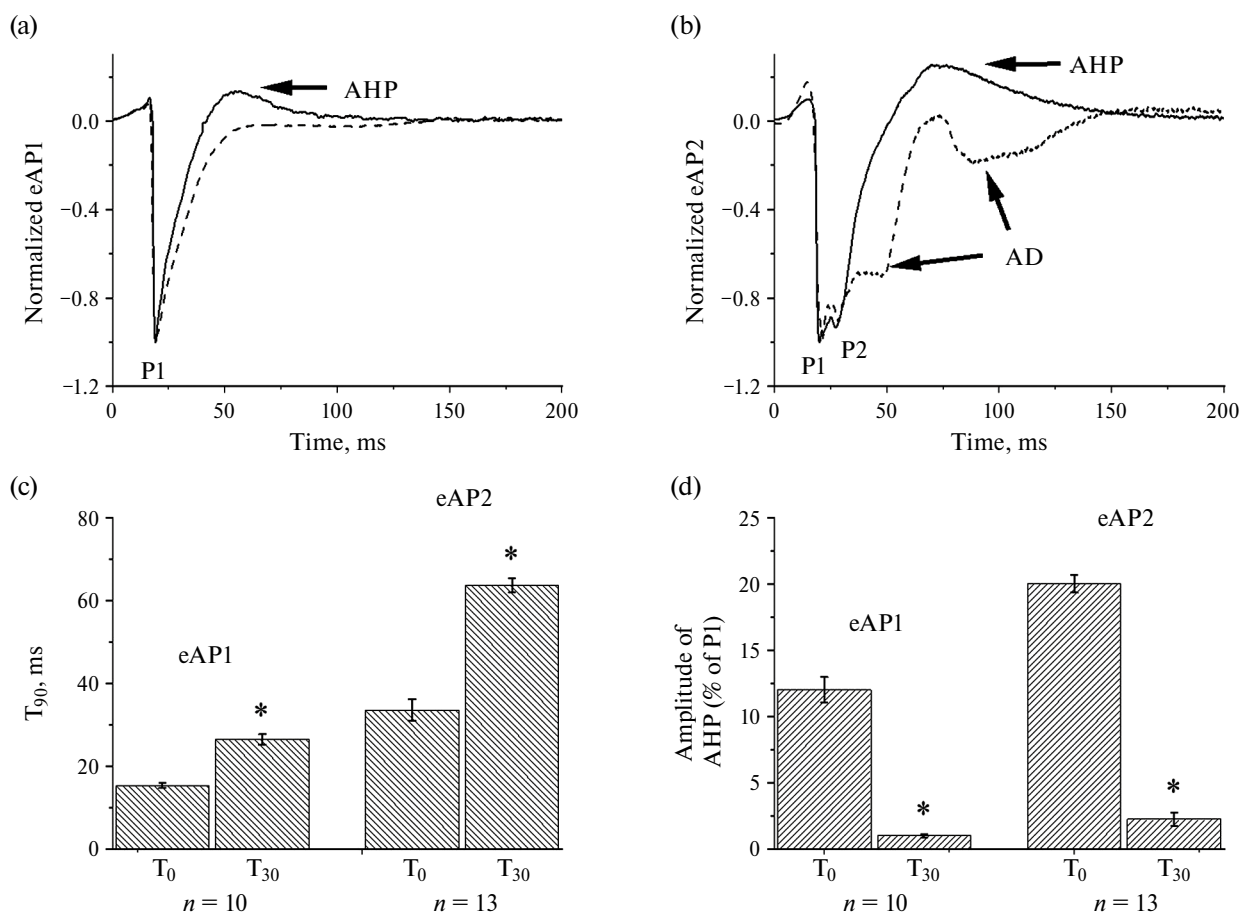


Рис. 5. Апамин модулирует спад вПД 1-го и 2-го типа эпикардиальных миоцитов ЛЖ сердца крыс ИР-группы.

(a), (b) – репрезентативные примеры вПД1 (eAP1) и вПД2 (eAP2) соответственно в начале (сплошная линия) и через 30 минут (пунктирная линия) после контакта кончика микропипетки, заполненной РТА. P1 и P2 – отметка пиков в составе профилей вПД. Стрелками отмечены СГ (AHP) и постдеполяризация (AD).

(c), (d) – соответственно средние значения T_{90} и амплитуды СГ (AHP), нормированной к величине P1, в ходе непрерывной регистрации вПД1 и вПД2 в начале (T_0) и через 30 минут (T_{30}) после контакта кончика микропипетки, заполненной РТА (n – число регистраций в группе из 5 животных).

* – достоверные отличия средних значений параметров вПД1 и вПД2 при T_{30} от среднего значения аналогичных параметров при T_0 ($p < 0.05$; парный t-критерий Стьюдента).

личение длительности вПД1, показанное в нашем исследовании, вероятнее всего, и определялось снижением реполяризующего I_{to} . В свою очередь, снижение длительности вПД2, наблюдаемое нами в модели ИР, опосредовалось, по всей вероятности, активацией SK-каналов, локализованных преимущественно в районе Т-трубочек [31]. Причём I_{SK} компенсировал и превышал снижение I_{to} .

Роль SK-каналов в формировании СГ и в определении длительности вПД кардиомиоцитов ЛЖ сердец постинфарктных крыс (по сравнению с ЛО-крысами) в данном исследовании подтверждается нашими экспериментами с локальной аппликацией блокатора SK-каналов апамина. Наблюдавшееся в этих экспериментах удлинение спада вПД1 и вПД2 не может быть объяснено блокированием других типов K^+ -токов реполяризационного резерва, поскольку апамин является высокоселективным блокатором именно SK-каналов [32]. Единственный известный ток, блокируемый апамином, — это ток через Ca^{2+} -каналы L-типа сердца куриного эмбриона [33]. Однако блокада этого деполяризующего тока, если бы происходила в сердечной мышце крысы, привела бы к укорочению, но не удлинению вПД2 и не оказывала бы влияния на вПД1, формирующийся активностью преимущественно натриевых и калиевых каналов поверхностной мембраны клетки.

Важно то, что апамин не изменял профили вПД вентрикулярных кардиомиоцитов ЛО-крыс, но блокировал СГ и продлевал фазу спада как вПД1, так и вПД2 кардиомиоцитов ИР-группы. Это наблюдение предполагает, что ИР ассоциируется с увеличением экспрессии/активности SK каналов как в поверхностном, так и в тубулярном компартментах субэпикардальных миоцитов ЛЖ сердца крысы. Продление спада вПД2 апамином сопровождалось также во многих случаях формированием дополнительных пиков постдеполяризация (after-depolarization, AD; рис 5b). Одной из возможных причин формирования этих пиков может быть избыточная электрогенная активность Na^+/Ca^{2+} -обменника, преимущественно локализованного на мембране тубулярного компартмента [34]. Показано, что такая активность может являться триггером желудочковой тахикардии, развивающейся на поздних сроках после ИМ и сердечной недостаточности [35]. Наблюдаемые в наших экспериментах повторные пики деполяризации на фоне действия апамина могут отражать входящие токи через Na^+/Ca^{2+} -обменник, вызванные как спонтанным освобождением Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула (задержанная постдеполяризация), так и накоплением этих ионов в субмембранном пространстве Т-системы (ранняя постдеполяризация) [20, 36]. Однако данное предположение требует до-

полнительной проверки. Вместе с тем тот факт, что эти пики деполяризации регистрируются только у вПД2, но не вПД1, свидетельствует об их активации именно в тубулярном компартменте мембраны, и в наших условиях они не приводят к развитию полноценной желудочковой тахикардии.

Стоит отметить, что BDM, применяемый в наших экспериментах для предотвращения сердечных сокращений, может модулировать некоторые ионные токи. Было показано, что BDM подавляет I_{to} и снижает активность Na^+/Ca^{2+} -обменника [37, 38]. В связи с этим стоит иметь в виду, что применение BDM может влиять на абсолютные значения ряда параметров ПД, включая его длительность. Однако в наших экспериментах BDM добавлялся во все растворы (РТ и РТА) при исследовании сердец обеих экспериментальных групп (ЛО и ИР). Поэтому описанные изменения профилей вПД в группе ИР-крыс по сравнению с ЛО-группой вряд ли могут быть отнесены к неспецифическим эффектам BDM.

В заключение отметим, что, согласно представленным данным, усиление экспрессии и/или активности SK-каналов в субэпикардальных миоцитах является одной из составляющих структурно-функционального ремоделирования миокарда ЛЖ сердца после ИМ. Значение (компенсаторное или патологическое) этого изменения для функции миокарда нуждается в дальнейшем исследовании.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

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, разработанным и утвержденным локальным этическим комитетом ИЭФБ РАН (Протокол № 5/2021 от 27.05.2021 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00264-24-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hundahl LA, Sattler SM, Skibbye L, Diness JG, Tfelt-Hansen J, Jespersen T (2017) Pharmacological blockade of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels by ICA reduces arrhythmic load in rats with acute myocardial infarction. *Pflugers Arch* 469: 739–750. <https://doi.org/10.1007/S00424-017-1962-6>
- Krause S, Hess ML (1984) Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia. *Circ Res* 55: 176–184. <https://doi.org/10.1161/01.RES.55.2.176>
- Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE (1987) Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 60: 700–707. <https://doi.org/10.1161/01.RES.60.5.700>
- Tsujii E, Tanaka H, Oyamada M, Fujita K, Hamamoto T, Takamatsu T (2003) In situ visualization of the intracellular Ca^{2+} dynamics at the border of the acute myocardial infarct. *Mol Cell Biochem* 248: 135–139. <https://doi.org/10.1023/A:1024188302849>
- Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, Nie L, Tuxson HR, Young JN, Glatter KA, Vázquez AE, Yamoah EN, Chiamvimonvat N (2003) Molecular identification and functional roles of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel in human and mouse hearts. *J Biol Chem* 278: 49085–49094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307508200>
- Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, Xu Y, Nie L, Vázquez AE, Nilas Young J, Glatter KA, Chiamvimonvat N (2005) Differential expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: 2714–2723. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00534.2005>
- Li N, Timofeyev V, Tuteja D, Xu D, Lu L, Zhang Q, Zhang Z, Singapuri A, Albert TR, Rajagopal A V., Bond CT, Periasamy M, Adelman J, Chiamvimonvat N (2009) Ablation of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation. *J Physiol* 587: 1087–1100. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2008.167718>
- Tuteja D, Rafizadeh S, Timofeyev V, Wang S, Zhang Z, Li N, Mateo RK, Singapuri A, Young JN, Knowlton AA, Chiamvimonvat N (2010) Cardiac small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circ Res* 107: 851–859. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.215269>
- Nagy N, Szuts V, Horváth Z, Seprényi G, Farkas AS, Acsai K, Prorok J, Bitay M, Kun A, Pataricza J, Papp JG, Nánási PP, Varró A, Tóth A (2009) Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? *J Mol Cell Cardiol* 47: 656–663. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2009.07.019>
- Chua SK, Chang PC, Maruyama M, Turker I, Shinohara T, Shen MJ, Chen Z, Shen C, Rubart-Von Der Lohe M, Lopshire JC, Ogawa M, Weiss JN, Lin SF, Ai T, Chen PS (2011) Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel and Recurrent Ventricular Fibrillation in Failing Rabbit Ventricles. *Circ Res* 108: 971–979. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.238386>
- Chang PC, Turker I, Lopshire JC, Masroor S, Nguyen BL, Tao W, Rubart M, Chen PS, Chen Z, Ai T (2013) Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. *J Am Heart Assoc* 2: <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.004713>
- Bonilla IM, Long VP, Vargas-Pinto P, Wright P, Belevych A, Lou Q, Mowrey K, Yoo J, Binkley PF, Fedorov V V., Györke S, Janssen PML, Kilic A, Mohler PJ, Carnes CA (2014) Calcium-Activated Potassium Current Modulates Ventricular Repolarization in Chronic Heart Failure. *PLoS One* 9: e108824. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108824>
- Lee YS oo, Chang PC, Hsueh CH, Maruyama M, Park H Wook, Rhee KS, Hsieh YC, Shen C, Weiss JN, Chen Z, Lin SF, Chen PS (2013) Apamin-Sensitive Calcium-Activated Potassium Currents in Rabbit Ventricles with Chronic Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 24: 1144–1153. <https://doi.org/10.1111/JCE.12176>
- Gui L, Bao Z, Jia Y, Qin X, Cheng ZJ, Zhu J, Chen QH (2013) Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00820.2011>
- Kubasov IV, Stepanov AV, Panov AA, Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG (2021) Role of Potassium Currents in the Formation of After-Hyperpolarization Phase of Extracellular Action Potentials Recorded from the Control and Diabetic Rat Heart Ventricular Myocytes. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2021 57:6 57: 1511–1521. <https://doi.org/10.1134/S0022093021060272>
- Grunnet M, Jensen BS, Olesen SP, Klaerke DA (2001) Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Pflugers Arch* 441: 544–550. <https://doi.org/10.1007/S004240000447>
- Kuzmenkov AI, Peigneur S, Nasburg JA, Mineev KS, Nikolaev M V., Pinheiro-Junior EL, Arseniev AS, Wulff H, Tytgat J, Vassilevski AA (2022) Apamin structure and pharmacology revisited. *Front Pharmacol* 13: 977440. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.977440>
- Skibbye L, Diness JG, Sørensen US, Hansen RS, Grunnet M (2011) The duration of pacing-induced atrial fibrillation is reduced in vivo by inhibition of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 57: 672–681. <https://doi.org/10.1097/FJC.0B013E318217943D>
- Chang PC, Hsieh YC, Hsueh CH, Weiss JN, Lin SF, Chen PS (2013) Apamin induces early afterdepolarizations and torsades de pointes ventricular arrhythmia from failing rabbit ventricles exhibiting secondary rises in intracellular calcium. *Heart Rhythm* 10: 1516–1524. <https://doi.org/10.1016/J.HRTHM.2013.07.003>
- Stepanov AV, Dobretsov MG, Novikova EV, Filippov YuA, Kubasov IV (2023) Remodeling of Extracellularly Recorded Action Potentials of Rat Heart Subepicardial Cardiomyocytes after Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2023 59:5 59: 1497–1509. <https://doi.org/10.1134/S0022093023050046>

21. Zhang R, Han D, Li Z, Shen C, Zhang Y, Li J, Yan G, Li S, Hu B, Li J, Liu P (2018) Ginkgolide C alleviates myocardial ischemia/reperfusion-induced inflammatory injury via inhibition of CD40-NF- κ B pathway. *Front Pharmacol* 9: 327207.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00109>
22. Ciuffreda MC, Tolva V, Casana R, Gneccchi M, Vanoli E, Spazzolini C, Roughan J, Calvillo L (2014) Rat Experimental Model of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: An Ethical Approach to Set up the Analgesic Management of Acute Post-Surgical Pain. *PLoS One* 9: e95913.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095913>
23. Murakami M, Niwa H, Kushikata T, Watanabe H, Hirota K, Ono K, Ohba T (2014) Inhalation Anesthesia Is Preferable for Recording Rat Cardiac Function Using an Electrocardiogram. *Biol Pharm Bull* 37: 834–839.
<https://doi.org/10.1248/BPB.B14-00012>
24. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W (1981) Early phase acute myocardial infarct size quantification: Validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 101: 593–600.
[https://doi.org/10.1016/0002-8703\(81\)90226-X](https://doi.org/10.1016/0002-8703(81)90226-X)
25. Kubasov I V., Stepanov A, Bobkov D, Radwanski PB, Terpilowski MA, Dobretsov M, Gyorke S (2018) Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. *Front Physiol* 9: 309292.
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00061>
26. Tejada T, Tan L, Torres RA, Calvert JW, Lambert JP, Zaidi M, Husain M, Berce MD, Naib H, Pejler G, Abrink M, Graham RM, Lefer DJ, Naqvi N, Husain A (2016) IGF-1 degradation by mouse mast cell protease 4 promotes cell death and adverse cardiac remodeling days after a myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 6949–6954.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1603127113>
27. Shimizu Y, Nicholson CK, Lambert JP, Barr LA, Kuek N, Herszenhaut D, Tan L, Murohara T, Hansen JM, Husain A, Naqvi N, Calvert JW (2016) Sodium sulfide attenuates ischemic-induced heart failure by enhancing proteasomal function in an Nrf2-dependent manner. *Circ Heart Fail* 9: 115.002368
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002368>
28. Abramochkin D V., Moiseenko LS, Kuzmin VS (2009) The effect of hydrogen sulfide on electrical activity of rat atrial myocardium. *Bull Exp Biol Med* 147: 683–686.
<https://doi.org/10.1007/s10517-009-0607-y>
29. Pustovit KB, Kuzmin VS, Abramochkin DV (2016) Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389: 303–313.
<https://doi.org/10.1007/s00210-015-1199-x>
30. Rozanski GJ, Xu Z, Zhang K, Patel KP (1998) Altered K⁺ current of ventricular myocytes in rats with chronic myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274: 1152.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.1.H259>
31. Zhang XD, Coulibaly ZA, Chen WC, Ledford HA, Lee JH, Sirish P, Dai G, Jian Z, Chuang F, Brust-Mascher I, Yamoah EN, Chen-Izu Y, Izu LT, Chiamvimonvat N (2018) Coupling of SK channels, L-type Ca²⁺ channels, and ryanodine receptors in cardiomyocytes. *Scientific Reports* 2018 8:1 8: 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22843-3>
32. Ishii TM, Maylie J, Adelman JP (1997) Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 272: 23195–23200.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23195>
33. Bkaily G, Sculptoreanu A, Jacques D, Economos D, Menard D (1992) Apamin, a highly potent fetal L-type Ca²⁺ current blocker in single heart cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 262: 1152.
<https://doi.org/10.1152/AJPHEART.1992.262.2.H463>
34. Scriven DRL, Dan P, Moore EDW (2000) Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76506-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76506-4)
35. Hegyi B, Bossuyt J, Griffiths LG, Shimkunas R, Coulibaly Z, Jian Z, Grimsrud KN, Sondergaard CS, Ginsburg KS, Chiamvimonvat N, Belardinelli L, Varró A, Papp JG, Pollesello P, Levijoki J, Izu LT, Boyd WD, Bányász T, Bers DM, Chen-Izu Y (2018) Complex electrophysiological remodeling in postinfarction ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E3036–E3044.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1718211115/SUPPL_FILE/PNAS.201718211SI.PDF
36. Weber CR, Piacentino V, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM (2002) Na⁺-Ca²⁺ Exchange Current and Submembrane [Ca²⁺] During the Cardiac Action Potential. *Circ Res* 90: 182–189.
<https://doi.org/10.1161/HH0202.103940>
37. Coulombe A, Lefevre IA, Deroubaix E, Thuringer D, Coraboeuf E (1990) Effect of 2,3-butanedione 2-monoxime on slow inward and transient outward currents in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 22: 921–932.
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(90\)90123-J](https://doi.org/10.1016/0022-2828(90)90123-J)
38. Watanabe Y, Iwamoto T, Matsuoka I, Ohkubo S, Ono T, Watano T, Shigekawa M, Kimura J (2001) Inhibitory effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 132: 1317–1325.
<https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703926>

INFLUENCE OF APAMIN ON THE EXTRACELLULARLY RECORDED ACTION POTENTIALS PROFILES OF SUBEPICARDIAL CARDIOMYOCYTES OF THE RAT HEART IN MYOCARDIAL INFARCTION

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

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

[#] e-mail: botanik2407@gmail.co

The role of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channels (SK channels) in the pathogenesis of cardiomyopathies of various etiologies remains poorly understood. The purpose of this work was to evaluate the effect of the blocker of SK channels, apamin, on the extracellularly recorded action potentials (eAPs) of subepicardial myocytes in the left ventricles of sham-operated rats and rats with myocardial infarction caused by ischemia-reperfusion. It was found that local delivery of the SK channel blocker apamin at a concentration of 500 nM to the eAP recording area did not affect the eAP profiles in the group of sham-operated rats but caused a significant slowdown in the repolarization time and a decrease in the afterhyperpolarization phase of eAPs in the group of rats with myocardial infarction. These data suggest that changes in the waveform of eAPs after infarction are associated with increased expression and/or activity of SK channels in subepicardial myocytes. The possible role of these channels in the structural and functional remodeling of the myocardium of the left ventricle of the heart after ischemia-reperfusion is discussed.

Keywords: myocardial infarction, cardiomyocytes, extracellular action potential, apamin, SK channels

КОНЦЕНТРАЦИЯ И СОСТАВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АДИПОЦИТАРНЫХ ВЕЗИКУЛ У БОЛЬНЫХ С ПОЛИПАМИ ТОЛСТОЙ КИШКИ И КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

© 2024 г. Н. В. Юнусова¹, Д. А. Сваровский^{1, *}, Е. С. Колегова², О. В. Черемисина², Д. Н. Костромицкий², И. В. Кондакова², Е. А. Сиденко², А. Ю. Добродеев², А. Е. Григорьева³

¹ Сибирский Государственный Медицинский Университет, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, Томск, Россия

² НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

* e-mail: svarovsky.d.a@gmail.com

Поступила в редакцию 29.03.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой гетерогенную популяцию мембранных частиц размером менее 1 мкм, секретируемую различными типами клеток. Большинство циркулирующих в крови человека ВВ являются частицами тромбоцитарного, лейкоцитарного, эритроцитарного и эндотелиального происхождения. Состав циркулирующих адипоцитарных ВВ при различных патологических состояниях практически не изучен. Малые ВВ из плазмы крови больных колоректальным раком (КРР) и полипами толстой кишки с наличием ожирения или метаболического синдрома выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием. Для изучения состава адипоцитарных ВВ использовали иммунопреципитацию в сочетании с Вестерн блоттингом и проточную цитометрию. Фракции везикул (FABP4- и CD11b-иммунопреципитированные ВВ, а также ВВ содержащиеся в супернатанте после удаления CD11b-позитивных ВВ) содержали комплекс адипоцитарных маркеров (FABP4, PPAR- γ и перилипин 1). Преципитированные на CD11b-покрытых частицах ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения у больных КРР без ожирения характеризовались сочетанной гиперэкспрессией FABP4 и перилипина 1, в то время как для больных КРР с метаболическим синдромом или ожирением такая гиперэкспрессия была нехарактерна. Фракция истинно адипоцитарных везикул (супернатант после удаления CD11b-позитивных ВВ) характеризовалась наличием у всех больных комплекса адипоцитарных маркеров с преимущественной экспрессией в ней FABP4 как у больных с метаболическим синдромом/метаболически здоровым ожирением, так и больных без метаболических нарушений. Для больных без ожирения для корректной характеристики циркулирующих ВВ из препаратов ВВ необходимо удалять методом иммунопреципитации или аналогичными методиками фракцию CD11b-позитивных моноцитарно-макрофагальных ВВ, а в супернатанте после удаления/сорбции преципитированных ВВ — изучать состав адипоцитарных везикул, используя набор маркеров (FABP4, PPAR- γ , перилипин 1 и др.). Причем у больных с метаболическими нарушениями с учетом незначительной экспрессии FABP4 в составе CD11b-иммунопреципитированных ВВ, по-видимому, предварительная деплеция препаратов везикул не столь необходима.

Ключевые слова: циркулирующие внеклеточные везикулы, адипоцитарные маркеры, ожирение, колоректальный рак, полипы толстой кишки

DOI: 10.31857/S0044452924040078, **EDN:** YQBQSR

ВВЕДЕНИЕ

У большинства больных колоректальным раком (КРР) опухоль развивается на фоне так называемого «метаболически здорового ожирения» или метаболического синдрома (более чем у 70% больных), ключевым патогенетическим моментом которого является гиперинсулинемия. Сходные метаболи-

ческие изменения также характерны для больных с полипами толстой кишки, а в случае развития аденоматозных полипов или ворсинчатых аденом толстой кишки такие гистологические находки однозначно трактуются как предраковые изменения [1, 2]. Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой гетерогенную популяцию мембранных частиц размером менее 1 мкм, секретируемую раз-

личными типами клеток. Большинство циркулирующих в крови человека ВВ являются частицами тромбоцитарного, лейкоцитарного, эритроцитарного и эндотелиального происхождения. Доказательства наличия в циркуляции ВВ адипоцитарного происхождения в крайне незначительном количестве у практически здоровых людей представлены в работах Catherine и соавт. [3] и Callie и соавт. [4]. Состав циркулирующих адипоцитарных ВВ при различных патологических состояниях практически не изучен, а большинство работ по этой тематике выполнены на моделях *in vitro* [3]. Везикулы различного состава могут секретироваться как адипоцитами, так и стромальными клетками жировой ткани. Предлагаемые кандидаты-маркеры везикул адипоцитарного происхождения (γ -рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом (PPAR γ), белок, связывающий жирные кислоты 4 (FABP4), преадипоцитарный секреторный фактор (PREF1) и перилипин 1 не являются строго специфичными для клеток жировой ткани, синтезируются также некоторыми иммунными клетками, в том числе макрофагами жировой ткани [3–7]. Таким образом, с использованием вышеперечисленных маркеров удастся обычно выделить смешанную фракцию адипоцитарных и моноцитарно-макрофагальных ВВ.

Целью исследования было изучение концентрации и состава циркулирующих адипоцитарных везикулах у больных с метаболическими нарушениями и без метаболических нарушений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач была сформирована группа больных КРР $n = 20$ (13 женщин и 7 мужчин, $T_{2-4}N_{0-2}M_0$, средний возраст 59.6 ± 1.60 лет), имеющих метаболический синдром или метаболически здоровое ожирение по критериям IDF (2007). Измерялись и рассчитывались антропометрические параметры: обхват талии, обхват бедер, индекс массы тела. Уровень глюкозы, общего холестерина, холестерина ЛПВП, холестерина ЛПНП и триглицеридов в плазме крови исследовали на биохимическом анализаторе Torus 1220, Dixon (Россия) после 16-часового голодания. Индекс инсулинорезистентности рассчитывался по формуле: $\text{НОМА-IR} = \text{уровень глюкозы натощак (ммоль/л)} \times \text{уровень инсулина натощак (мкЕд/мл)} / 22.5$. В качестве групп сравнения были сформированы группы больных с аденоматозными полипами или ворсинчатыми аденомами толстой кишки с метаболическим синдромом или метаболически здоровым ожирением (ПТК) ($n = 15$, 8 мужчин и 7 женщин, средний возраст 54.2 ± 2.20 года) и группа больных КРР с нормальной массой тела ($n = 10$, 5 мужчин и 5 женщин, $T_{2-4}N_{0-2}M_0$, средний возраст 60.6 ± 1.91 лет), не имеющих метаболических нарушений. Всем паци-

ентам проводилась магнитнорезонансная томография на МРТ-сканере MAGNETOM ESSENZA 1,5 T (Siemens, Эрланген, Германия) с поверхностно-фазированной катушкой Body Matrix и эндоскопическое исследование с забором материала для гистологического исследования.

Изоляция ВВ. Малые ВВ из плазмы крови больных выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием (ультрацентрифуга OptimaXP, Beckman Coulter). Фракционирование клеток крови (около 18 мл венозной крови, стабилизированной ЭДТА) выполнялось на высокоскоростной центрифуге с угловым ротором при 4°C в течение 20 мин при ускорении 1000g (TGL-24MC, Drawell, Китай). Полученную при первом центрифугировании плазму повторно центрифугировали при 4°C , 20 мин, 13000g. Супернатант разводили PBS и фильтровали через фильтры с диаметром пор 220 нм (Minisart high flow 16553-K, Sartorius, Германия). Фильтрат подвергался ультрацентрифугированию дважды на ультрацентрифуге с бакет-ротором (Optima XPN 80, Beckman Coulter, США), 4°C , 90 мин, 100 000g. Полученные аликвоты малых ВВ хранили при -80°C .

Электронная микроскопия, NTA анализ и проточная цитометрия. Для подтверждения морфологии выделенных частиц проводилась трансмиссионная электронная микроскопия. Изолированные частицы адсорбировались в течение 1 мин на медных сетках, покрытых карбонизированной пленкой. Затем сетки подвергались воздействию в течение 5–10 сек 0.5% уранилацетата. Препараты были изучены на микроскопе Jem1400 (Jeol, Япония). Распределение и концентрация выделенных везикул изучены с помощью метода анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) с использованием прибора NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Великобритания). Для оптимизации измерений образцы везикул разводились PBS в пропорциях 1:100, 1:1000 и 1:10000. Анализировались средний гидродинамический диаметр (размер везикул, их распределение) и концентрация везикул. Для подтверждения везикулярной природы выделенных частиц исследовали уровень тетраспанинов CD81, CD63 и гликопротеина CD24 методом проточной цитометрии с использованием методологии сорбции везикул на латексных частицах. Цитометрия выполнена на приборе Cytotflex (Beckman Coulter, США), полученные данные анализировались с помощью программы CytExpert 2.0 Software. Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) ВВ была проанализирована по сравнению с изотипическими и отрицательными контролями.

Оценка белка в препаратах ВВ. В работе использовался флюориметрический метод оценки белка с флюорескаминном (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/Fluorescamine-protocol.pdf>). Для определения белка 10 мкл препаратов ве-

зикул смешивали с 3 мкл лизирующего буфера (0.25 М Tris-HCl, 8% SDS, 0.2 М DTT, pH 6,8) на льду (10 мин), кипятили при 95 градусах в течение 10 мин. После центрифугирования при 12000 g в течение 10 мин весь надосадок смешивали с 3 мкл раствора флюорескамина (3 мг/мл, CAS 38183, BLD Pharm, Shanghai, China) в DMSO. Измерение проводили на ридере Agilent BioTek Cytation 1 Cell Imaging Multimode Reader (Biotek, США), длина волны возбуждения — 365 нм, длина волны эмиссии — 470 нм. Предварительно строили калибровку с использованием водных стандартов трипсина (трипсин кристаллический порошок лиофил., 10 мг фл, Россия).

Иммунопреципитация везикул и Вестерн блоттинг. Для исследования состава циркулирующих адипоцитарных везикул выполнена иммунопреципитация на предварительно отмытых в PBS альдегидных латексных частицах, покрытых антителами к FABP4 и CD11b. Пять микролитров 3×10^5 альдегид-сульфатных латексных частиц диаметром 4 мкм (4%, A37304, “Invitrogen”, США) отмывали дважды по 100 мкл 0.1 М MES-буфером pH 5.5 (3000g, 15 мин, комнатная температура) и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. Затем к частицам добавляли по 3 мкг моноклональных антител против CD11b (E-AB-F10081A, Elabscience, USA) и FABP-4 (FAB693Hu01, Cloud-Clone Corp., Китай) и инкубировали при комнатной температуре в течение 14 ч при перемешивании. Аликвоты выделенных из крови ВВ (около 35 мкг белка) инкубировали с комплексами антитело-латексных частицы (3 мкл отмытых комплексов) при комнатной температуре в течение 2 ч, шейкер 400 rpm. Далее образцы центрифугировали при 600g, 4°C, 15 мин. Фракции в осадках представляли собой иммунопреципитированные ВВ моноцитарно-макрофагатного происхождения и общую фракцию FABP4-позитивных ВВ плазмы крови. Эти фракции и супернатант ВВ после удаления CD11b-позитивных ВВ были лизированы (0.05 М Tris-HCl, pH 7.4; 0.15 М NaCl, 1% Triton X-100, 1% SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза (леупептин, пепстатин, апротинин) в течение полутора часов, при +4°C, далее образцы подвергали обработке ультразвуком на установке Sonopuls mini20 (Банделин, Германия) с ультразвуковым датчиком MS1 в течение 90 сек. во льду. После центрифугирования (13 000 g, 15 мин), экстракты протеинов были нормализованы по белку. Электрофорез проводился в 12.5% SDS-ПААГ, для нанесения использовался стандартный нередуцирующий буфер. Разделенные электрофорезом белки переносили на PVDF мембрану (Immobilon, Millipore, США). Мембрану блокировали 1X раствором iBind (Invitrogen, США). Окрашивание первичными и вторичными антителами выполнено с использованием устройства iBind Western Device (Thermo Scientific, США) в течение 3-3.5 ч [8]. В работе использовали следующие моно- и поликлональные антитела: антитело к CD63 (CSB-MA004950A0, Cusabio, Китай)

разведение 1:3000), антитело к FABP4 (MA5-29255, Invitrogen, США) разведение 1:2000, антитело к PPAR gamma (AF6284, Affinity Biosc., Китай) разведение 1:2000, антитело к перилипину 1 (DF7602, Affinity Biosc., Китай) разведение 1:2000, HRP-конъюгированные антикроличьи и антимышинные антитела (Cloud-Clone Corp., Китай), разведение 1:3000. Далее мембрану инкубировали с системой детектирования Affinity ECL субстрат для Вестерн блоттинга (KF8001, Affinity Biosc., Китай). Визуализацию осуществляли на системе ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы ImageLab. Полученные результаты стандартизировали по уровню CD63 в ВВ и уровню соответствующих протеинов в ВВ больных с полипами толстой кишки с метаболическими нарушениями. В качестве стандарта молекулярной массы использовали MagicMark XP Western Protein Standard (LC5603, Life Technologies, США).

Статистическая обработка. Для всех видов анализа статистически значимыми считались различия при уровне значимости $p < 0,05$. Проверка нормальности распределения исследуемых выборок проводилась с использованием критерия Шапиро—Уилка. В таблице и на рисунках данные представлены как медианы с интерквартильным размахом. Для оценки значимости различий в выборках использовал критерий Краскал—Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделенные ВВ при трансмиссионной электронной микроскопии визуализировались как округлые мембранные структуры размером не более 220 нм. Также в препаратах присутствовали немембранные структуры обычно размером не более 100 нм — “не-везикулы”. Выделенные везикулы экспрессировали CD9, CD81, CD63, CD24. Средняя концентрация циркулирующих ВВ у больных ПТК и КРР значимо не отличалась и составила $25.1 \pm 2.33 \times 10^9$ и $24.0 \pm 4.92 \times 10^9$ частиц/мл крови, соответственно. Средний размер везикул у больных ПТК с полипами составил 95.3 ± 11.1 нм, у больных КРР — 96.2 ± 9.70 нм (рис. 1).

Образцы ВВ пяти больных из всех групп были использованы для анализа концентрации, среднего размера везикул и общего белка во фракциях ВВ до иммунопреципитации, в супернатантах после иммунопреципитации на анти-CD11b латексных частицах и после последовательной иммунопреципитации на анти- CD11b и анти-FABP4 латексных частицах (рис. 2). Максимальная концентрация везикул отмечена у больных КРР с метаболическим синдромом. Концентрация везикул у больных с ПТК с метаболическим синдромом практически в 2 раза ниже, а у больных с КРР без метаболических нарушений — в 8 раз ниже по сравнению с больными с КРР с синдромом, $p < 0.05$, $n = 5$ (рис. 2а). Во всех группах

концентрация везикул несколько снижалась при удалении везикул моноцитарно-макрофагального ряда методом иммунопреципитации и далее снижалась крайне незначительно после удаления из супернатанта еще и FABP4-позитивных ВВ. Аналогичная динамика выявлена и для белка ВВ (рис. 2с). После удаления везикул моноцитарно-макрофагального происхождения фракции по размеру становятся более гомогенными по размеру частиц (рис. 2d), а средний размер везикул несколько уменьшался у больных с ПТК с метаболическими нарушениями и у больных КРР без метаболических нарушений. До иммунопреципитации средний размер везикул у больных ПТК с метаболическими нарушениями и у больных КРР без метаболических нарушений составил 95.3 ± 11.0 нм и 106.7 ± 6.04 нм, соответственно, а после иммунопреципитации — 77.7 ± 4.00 нм и 91.7 ± 5.02 нм, соответственно, $p < 0.05$, $n = 5$. В тоже время, у больных КРР с метаболическими нарушениями средний размер везикул до и после иммунопреципитации практически не изменил-

ся, 91.0 ± 2.51 нм и 92.7 ± 3.05 нм, соответственно, $p > 0.05$, $n = 5$ (рис. 2d).

Уровень FABP4, перилипина 1 и PPAR- γ во фракциях циркулирующих ВВ у больных с метаболическими нарушениями и без них представлен на рисунке 3. Видно, что все фракции циркулирующих везикул содержат комплекс адипоцитарных маркеров (FABP4, PPAR γ и перилипин 1). Необходимо отметить, что преципитированные на CD11b-покрытых частицах ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения у больных КРР без ожирения характеризовались сочетанной гиперэкспрессией FABP4 и перилипина 1, в то время как для больных КРР с метаболическим синдромом или ожирением такая гиперэкспрессия была нехарактерна (рис.3b). Истинно адипоцитарные везикулы, как мы полагаем, находятся преимущественно в препаратах после удаления из них везикул моноцитарно-макрофагального происхождения. Эта фракция характеризовалась наличием у всех больных комплекса адипоцитарных маркеров с преимущественной экспрессией в ней FABP4 как у больных с мета-

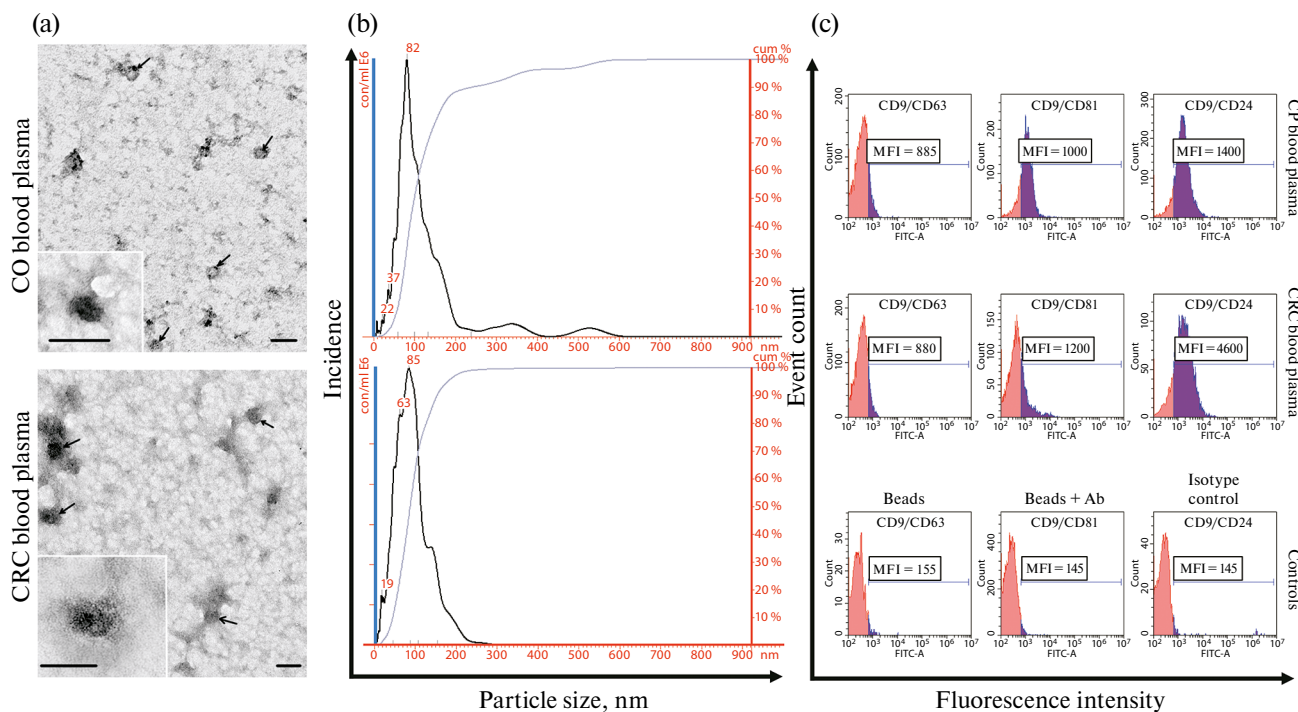


Рис. 1. Идентификация изолированных ВВ. (а) — ТЭМ показала наличие везикул с типичной морфологией и отсутствие везикул размером более 220 нм. На вставках показаны малые ВВ. Масштабные линии соответствуют 100 нм. Электронная микроскопия, отрицательное окрашивание уранилацетатом; (б) — данные анализа NTA для ВВ, изолированных из плазмы крови больных КРР и ПТК (CRC and CP). Ось абсцисс представляет собой размер частиц (нм), ось ординат — концентрацию частиц (частиц/мл), вспомогательная ось — кумулятивная частота (%). (с) — Экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9-положительных sEV КРР и ПТК плазмы крови. Показаны репрезентативные средние значения интенсивности флуоресценции (MFI), каждое измерение выполнялось трижды. Для изотипического контроля (гистограмма справа) меченные комплексы частицы-антитело к CD9-sEV инкубировали с мышиным FITC IgG1 контрольным изотипом или FITC IgG2a контрольным изотипом. Показан один из репрезентативных изотипических контролей. В качестве отрицательного контроля к латексным частицам, меченым антителами CD9 (гистограмма слева), ничего не добавляли. Так же ставили отрицательный контроль, когда покрытые частицы инкубировали с антителами, конъюгированными с FITC без добавления везикул (гистограмма в центре).

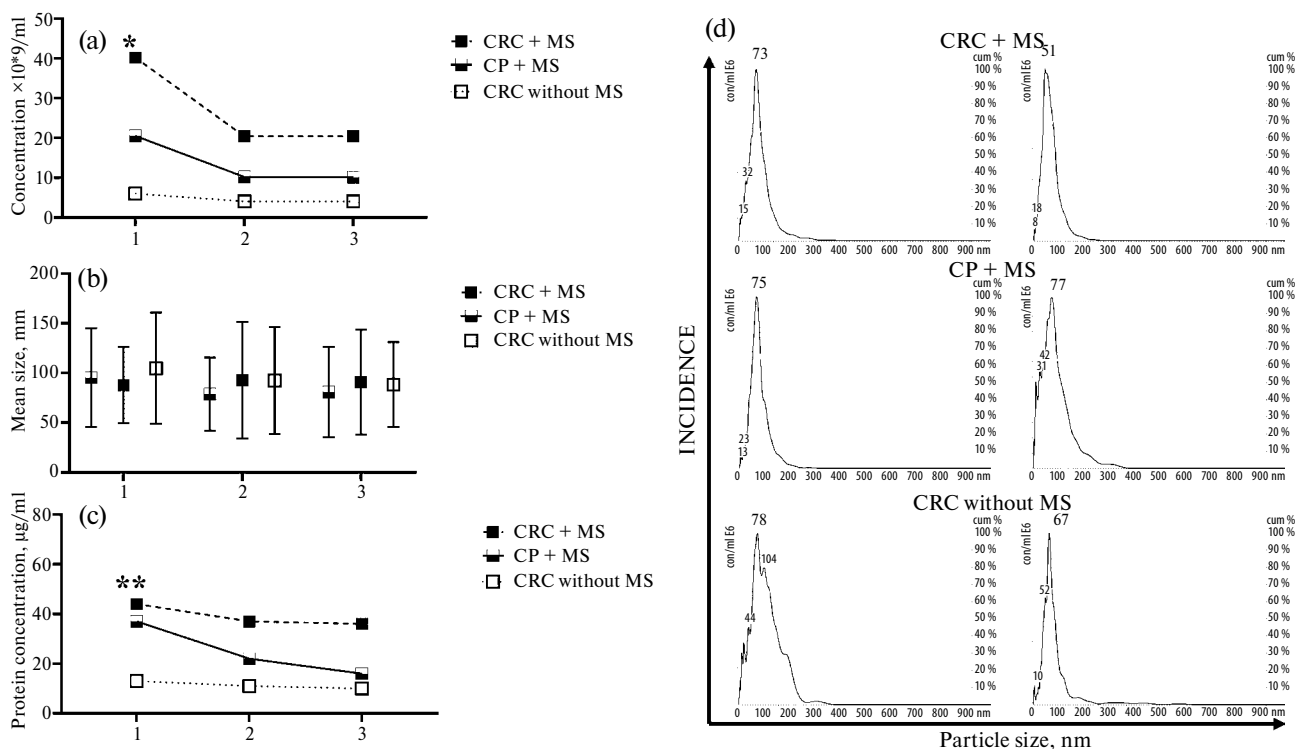


Рис. 2. Концентрация, размер ВВ и уровень общего белка во фракциях и супернатанте при иммунопреципитации. (a) — концентрация ВВ в препаратах: 1 — до иммунопреципитации, 2 — в супернатанте после иммунопреципитации CD11b-позитивных ВВ, 3 — в супернатанте после последовательной иммунопреципитации CD11b-позитивных и FABP4-позитивных ВВ у больных КРП с метаболическими нарушениями (CRC+MS) (темные боксы), у больных ПТК с метаболическими нарушениями (CP+MS) (штрихованные боксы), и больных КРП без метаболических нарушений (CRC without MS) (светлые боксы). * — различия достоверны по сравнению с концентрацией ВВ у больных CP+MS и CRC without MS, $p < 0.05$. (b) — средний размер везикул у больных в супернатантах до и после иммунопреципитации; (c) — концентрация белка в образцах ВВ больных в супернатантах до и после иммунопреципитации, ** — различия достоверны по сравнению с концентрацией белка в везикулах у больных CRC without MS, $p < 0.05$. (d) — данные анализа NTA в образцах циркулирующих ВВ больных до иммунопреципитации (слева) и после иммунопреципитации CD11b-позитивных ВВ (справа). Ось абсцисс представляет собой размер частиц (нм), ось ординат — концентрацию частиц (частиц/мл), вспомогательная ось — кумулятивная частота (%).

болическим синдромом/метаболически здоровым ожирением, так и больных без метаболических нарушений (рис. 3с).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема как качественной, так и количественной идентификации циркулирующих ВВ адипоцитарного происхождения обусловлена, с одной стороны, известным фактом, что несколько типов клеток жировой ткани, включая адипоциты, макрофаги, мезенхимальные стволовые клетки и эндотелиальные клетки жировой ткани секретируют везикулы, которые, в свою очередь, действуют паракринным или эндокринным образом, опосредуют межклеточные и межорганные взаимосвязи [9]. С другой стороны, ранее было показано, что неассоциированные с жировой тканью моноциты и макрофаги, например, макрофаги ткани легких, селезенки, макрофаги атеросклеротических бляшек, а также, например, высокоспециализированные

клетки крипт тонкого кишечника — клетки Панета также экспрессируют классические адипоцитарные маркеры, везикулы от которых могут находиться в циркуляции [10–12].

Аналогичная предлагаемой методика ранее использовалась для характеристики ВВ адипоцитарного происхождения, находящихся в циркуляции у человека, где были представлены убедительные данные, что сочетание CD9, FABP4, PPAR- γ , адипонектина и перилипина 1 в выделенных из плазмы крови ВВ с наибольшей вероятностью детектирует именно ВВ адипоцитарного происхождения [3]. FABP4 является переносчиком жирных кислот, который преимущественно экспрессирован на адипоцитах и макрофагах. Он связывает длинноцепочечные жирные кислоты и ретиноевую кислоту, а также транспортирует их в ядро. FABP4 является популярным и часто используемым маркером ВВ адипоцитарного происхождения, имеющим определенные преимущества перед другими кандидатными маркерами (адипонектин, PPAR- γ , перилипин 1)

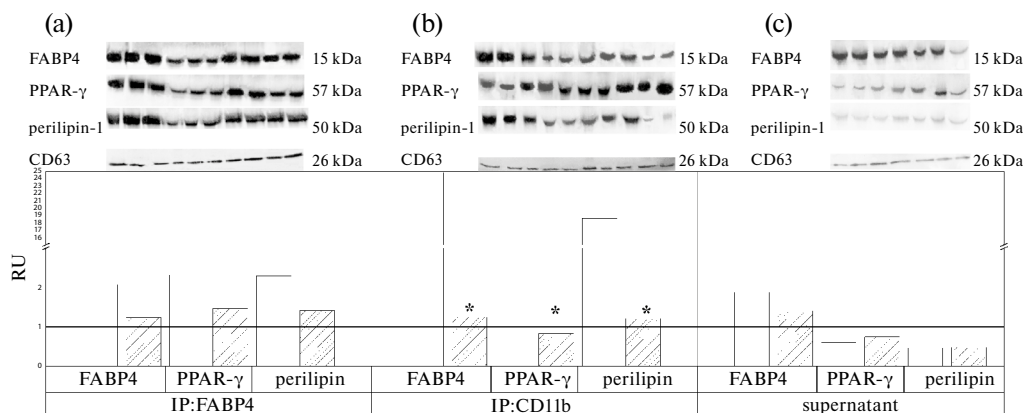


Рис. 3. Уровни FABP4, перилипина-1 и PPAR- γ во фракциях циркулирующих ВВ после иммунопреципитации ВВ на латексных частицах, покрытых антителами к FABP4 (а), к CD11b (б) и в супернатанте после удаления ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения (с) у больных КРР без метаболических нарушений (светлые столбцы) и КРР с метаболическими нарушениями (штрихованные столбцы) по сравнению с больными с полипами толстой кишки с метаболическими нарушениями (СР). RU — условные единицы. Дорожки 1, 2, 3 — больные КРР без метаболических нарушений, 4-7 — больные КРР с метаболическими нарушениями, 8-10 — полипы толстой кишки с метаболическими нарушениями (3а, 3б). Дорожки 1, 2 — больные КРР без метаболических нарушений, 3-5 — больные КРР с метаболическими нарушениями, 6-7 — полипы толстой кишки с метаболическими нарушениями (3с). Вестерн блоттинг. * — различия достоверны по сравнению с группой больных КРР без метаболических нарушений, $p < 0.05$, $n = 20$.

такие как, высокая концентрация и поверхностная локализация маркера на ВВ, позволяющая использовать удобный и высокопроизводительный метод проточной цитометрии для детекции таких везикул [4, 13, 14]. Хотя нельзя исключать, что FABP4 как секретируемый белок, присутствующий в плазме крови в растворимом виде, сорбируется также в так называемой “короне” ВВ [4]. Анализ ВВ, выделенных из ex vivo культур эксплантатов жировой ткани человека, выявил как адипонектин-положительные, так и адипонектин-отрицательные подгруппы с помощью дифференциального ультрацентрифугирования в сочетании с иммуноблоттингом. Однако, поскольку адипонектин в везикулах детектировался иммуноблоттингом, остается неизвестным, находится ли адипонектин на поверхности или внутри адипоцитарных ВВ [15, 16]. Уровень циркулирующих ВВ, позитивных по перилипину 1 резко увеличился как у мышей с диет-индуцированным ожирением, так и у пациентов с ожирением. Кроме того, у людей с ожирением уровень перилипин-позитивных циркулирующих ВВ положительно коррелировал с уровнем инсулина в плазме и индексом инсулинорезистентности НОМА-IR. Это также нацеливает в перспективе на возможность использования перилипин-1-позитивных ВВ как биомаркера инсулинорезистентности, однако этот маркер может быть определен только иммуноблоттингом [6]. Используя FABP4 в качестве маркера для идентификации адипоцитарных ВВ в кровотоке, Hupal и соавт. обнаружили, что содержание микроРНК в циркулирующих адипоцитарных ВВ, нацеленных на различные гены в каноническом пути передачи сигналов, опосредованного рецептором инсулина,

значительно изменилось через 1 год после бариатрической хирургии. Эти изменения были связаны с уменьшением инсулинорезистентности, что позволяет предположить, что FABP4-положительные ВВ могут быть полезны для мониторинга метаболического статуса пациентов с ожирением после хирургического вмешательства [14].

Фракция супернатанта ВВ после удаления из нее CD11b-позитивных ВВ в нашем исследовании с большой долей вероятности представляет фракцию, содержащую ВВ преимущественно адипоцитарного происхождения. Судя по полученным данным в этой фракции во всех клинических группах уровень FABP4 был несколько выше по сравнению с другими адипоцитарными маркерами, однако все изученные адипоцитарные маркеры присутствовали в этой фракции ВВ (рис.3с). При анализе фракции CD11b-иммунопреципитированных ВВ выявлено, что также у всех пациентов эта фракция содержит комплекс маркеров FABP4, перилипин 1 и PPAR- γ , однако соотношение белков различно. У больных КРР с нормальной или сниженной массой тела уровень FABP4 в этой фракции в 24 раза выше по сравнению с больными с ПТК с метаболическим синдромом или ожирением и практически в 19 раз выше по сравнению с КРР с метаболическим синдромом или ожирением (рис. 3б). Из этого следует, что у больных без метаболических нарушений, по-видимому, для более корректной характеристики циркулирующих ВВ сначала из препаратов ВВ необходимо удалить методом иммунопреципитации или аналогичными методиками фракцию CD11b-позитивных моноцитарно-макрофагальных ВВ, а в супернатанте после

удаления/сорбции преципитированных ВВ можно изучать состав адипоцитарных везикул, например, используя предлагаемый набор маркеров. Причем у больных с метаболическими нарушениями с учетом незначительной экспрессии FABP4 в составе CD11b-иммунопреципитированных ВВ, по-видимому, предварительная деплеция препаратов везикул не столь необходима.

При выполнении проточной цитометрии с укрупнением везикул на латексных или магнитных частицах для изучения циркулирующих адипоцитарных везикул наиболее перспективно и логично использовать покрытые антителами к FABP4 частицы или при работе по методологии прямой детекции ВВ — после выполнения калибровки с калибровочными частицами — окрашивать ВВ комплексом антител, включающим FABP4 antibody, как в исследовании Gustafson с соавт. [4].

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.В.Ю., И.В.К.), сбор данных (О.В.Ч., К.Д.Н., А.Ю.Д.), обработка данных (Д.А.С., Е.С.К.), экспериментальные работы (Е.С.К., Н.В.Ю., Д.А.С., Е.А.С., А.Е.Г.) написание и редактирование манускрипта (Н.В.Ю., И.В.К.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №5 от 10 февраля 2019 г.). Информированное согласие было получено от всех пациентов, участвовавших в исследовании.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00085, <https://rscf.ru/project/23-25-00085/>

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят благодарность Татьяне Александровне Штам, старшему научному сотруднику группы клеточных и биомедицинских технологий НИЦ “Курчатовский институт”, ПИЯФ, Санкт-Петербург, канд биол. наук за выполнение блока работы анализ траектории частиц выделенных везикул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yunusova NV, Kondakova IV, Kolomiets LA, Afanas'ev SG, Kishkina AY, Spirina LV (2018) The role of metabolic syndrome variant in the malignant tumors progression. *Diabetes Metab Syndr*. 12(5):807–812. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.04.028>.
2. Borisov AV, Zakharova OA, Samarinova AA, Yunusova NV, Cheremisina OV, Kistenev YV. (2022) A Criterion of Colorectal Cancer Diagnosis Using Exosome Fluorescence-Lifetime Imaging. *Diagnostics* (Basel). 12(8):1792. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12081792>
3. Connolly KD, Wadey RM, Mathew D, Johnson E, Rees DA, James PE (2018) Evidence for Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in the Human Circulation. *Endocrinology*. 159(9):3259–3267. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00266>
4. Gustafson CM, Shepherd AJ, Miller VM, Jayachandran M (2015) Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol Sex Differ*. 6:10. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0028-8>
5. Furuhashi M (2019) Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 26(3):216–232. <https://doi.org/10.5551/jat.48710>
6. Eguchi A, Lazic M, Armando AM, Phillips SA, Katebian R, Maraka S, Quehenberger O, Sears DD, Feldstein AE (2016) Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J Mol Med (Berl)*. 94(11):1241–1253. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1446-8>
7. DeClercq V, d'Eon B, McLeod RS (2015) Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways. *Biochim Biophys Acta* 1851(9):1123–1133. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2015.04.005>
8. Yunusova N, Kolegova E, Sereda E, Kolomiets L, Villert A, Patysheva M, Reveda I, Grigor'eva A, Tarabanovskaya N, Kondakova I, Tamkovich S (2021) Plasma Exosomes of Patients with Breast and Ovarian Tumors Contain an Inactive 20S Proteasome. *Molecules*. 26(22):6965. <https://doi.org/10.3390/molecules26226965>
9. Huang Z, Xu A (2021) Adipose Extracellular Vesicles in Intercellular and Inter-Organ Crosstalk in Metabolic Health and Diseases. *Front Immunol*. 12:608680. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.608680>
10. Persson J, Degerman E, Nilsson J, Lindholm MW (2007) Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 363(4):1020–1026. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.074>
11. Namgaladze D, Kemmerer M, von Knethen A, Brüne B (2013) AICAR inhibits PPAR γ during monocyte differentiation to attenuate inflammatory responses to atherogenic lipids. *Cardiovasc Res*. 98(3):479–487. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt073>
12. Su X, Yan H, Huang Y, Yun H, Zeng B, Wang E, Liu Y, Zhang Y, Liu F, Che Y, Zhang Z, Yang R (2015) Expression of FABP4, adipin and adiponectin in Paneth cells is modulated by gut Lactobacillus. *Sci Rep*. 5:18588. <https://doi.org/10.1038/srep18588>
13. Kralisch S, Ebert T, Lossner U, Jessnitzer B, Stumvoll M, Fasshauer M. (2015) Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int J Obes (Lond)*. 38(9):1251–1254. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.232>
14. Hubal MJ, Nadler EP, Ferrante SC, Barberio MD, Suh JH, Wang J, Dohm GL, Pories WJ, Mietus-Snyder M, Freishtat RJ (2017) Circulating adipocyte-derived exosomal Mi-

- croRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity* (Silver Spring). 25(1):102–110. <https://doi.org/10.1002/oby.21709>
15. Kranendonk ME, Visseren FL, van Balkom BW, Nolte-’t Hoen EN, van Herwaarden JA, de Jager W, Schipper HS, Brenkman AB, Verhaar MC, Wauben MH, Kalkhoven E (2014) Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity* (Silver Spring). 22(5):1296–1308. <https://doi.org/10.1002/oby.20679>
16. Phoonsawat W, Aoki-Yoshida A, Tsuruta T, Sonoyama K (2014) Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum. *Biochem Biophys Res Commun* 448:1–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.11447>

CONCENTRATION AND COMPOSITION OF CIRCULATING VESICLES OF ADIPOCYTIC ORIGIN IN PATIENTS WITH COLON POLYPS AND COLORECTAL CANCER

N. V. Yunusova^a, D. A. Svarovsky^{a, #}, E. S. Kolegova^b, O. V. Cheremisina^b, D. N. Kostromitsky^b, I. V. Kondakova^b, E. A. Sidenko^b, A. Yu. Dobrodeev^b and A. E. Grigor’eva^c

^a *Siberian State Medical University, Department of Biochemistry and Molecular Biology with a course of clinical laboratory diagnostics, Tomsk, Russia*

^b *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia*

^c *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

[#] *e-mail: svarovsky.d.a@gmail.com*

Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous population of membrane particles less than 1 µm in size, secreted by various cell types. Most EVs circulating in human blood are particles of platelet, leukocyte, erythrocyte and endothelial origin. The composition of circulating adipocyte EVs in various pathological conditions has been virtually unknown. Small EVs from the blood plasma of patients with colorectal cancer (CRC) and colon polyps with obesity or metabolic syndrome were isolated by ultrafiltration with double ultracentrifugation. To study the composition of adipocyte EVs, immunoprecipitation in combination with Western blotting and flow cytometry were used. Vesicle fractions (FABP4- and CD11b-immunoprecipitated EVs, as well as EVs contained in the supernatant after removal of CD11b-positive EVs) contained a complex of adipocyte markers (FABP4, PPAR-γ and perilipin 1). EVs of monocyte-macrophage origin precipitated on CD11b-coated particles in CRC patients without obesity were characterized by combined overexpression of FABP4 and perilipin 1, while such overexpression was not typical for CRC patients with metabolic syndrome or obesity. The fraction of truly adipocyte vesicles (supernatant after removal of CD11b-positive EVs) was characterized by the presence in all patients of a complex of adipocyte markers with predominant expression of FABP4 in both patients with metabolic syndrome/metabolically healthy obesity and patients without metabolic disorders. To correctly characterize circulating EVs of patients without obesity, it is first necessary to remove the fraction of CD11b-positive monocyte-macrophage EVs from EV preparations by immunoprecipitation or similar methods, and in the supernatant after removal/sorption of precipitated EVs, the composition of adipocyte vesicles can be studied using a set of markers (FABP4, PPAR-γ, perilipin 1, etc.). Moreover, in patients with metabolic disorders, taking into account the insignificant expression of FABP4 in CD11b-immunoprecipitated EVs, preliminary depletion of vesicle preparations is apparently not so necessary.

Keywords: circulating extracellular vesicles, adipocyte markers, obesity, colorectal cancer, colon polyps

ИММУНИЗАЦИЯ САМЦОВ МЫШЕЙ BALB/C И C57BL/6 ИЗМЕНЯЕТ СОСТАВ ИХ МОЧИ И РЕАКЦИЮ САМОК НА ЕЕ ЗАПАХ

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

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

²Федеральный исследовательский центр Институт катализа им. Г. К. Борескова
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 09.04.2024 г.

После доработки 04.06.2024 г.

Принята к публикации 04.06.2024 г.

Запах играет важную роль в коммуникации животных и выборе партнера для спаривания. После заражения или активации иммунной системы самцов мышей запах их мочи становится менее привлекательным для половозрелых самок. Развитие иммунного ответа на ранних стадиях связано с продукцией различных цитокинов, как провоспалительных, так и противовоспалительных. Чтобы исследовать химическую основу наблюдаемых различий и проанализировать эффекты взаимодействия самок с запахом антигенстимулированных самцов, мы иммунизировали самцов инбредных линий мышей BALB/c (Th1) и C57BL/6 (Th2) гемоцианином (KLH). Для самок обеих исследованных линий привлекательность запаха мочи самцов, собранной через 3 дня после иммунизации, оказалась ниже по сравнению с запахом контрольных самцов. При этом самки линии BALB/c меньше обнюхивали мочу иммунизированных самцов, а самки C57BL/6 демонстрировали меньшую продолжительность груминга в тестах с мочой иммунизированных самцов. Измененная реакция самок на запах мочи самцов, собранной на 3-й день после введения KLH, совпала с антиген-индуцированной модуляцией относительных уровней летучих органических соединений (ЛОС), которые были обнаружены в образцах мочи методами газовой хроматографии и масс-спектропии. (ГХ-МС). У самцов обеих линий после введения KLH наблюдалось увеличение содержания нонанала, бензотиазола, а также 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазола, и [1,4,5]-оксидитиопана. При этом не было обнаружено соединений, содержание которых разнонаправленно изменяется в моче самцов после иммунизации в зависимости от линии животного.

Ключевые слова: иммунизация мышей, предпочтение полового партнера, запах мочи, ольфакторный тест, нонаналь, бензотиазол, 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол, SBT

DOI: 10.31857/S0044452924040089, **EDN:** YPZAGF

ВВЕДЕНИЕ

Данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что выбор самкой полового партнера носит селективный характер, и ключевую роль в этом выборе играют физиологические механизмы дистанционной рецепции [1–3]. В зависимости от таксономической принадлежности и видоспецифического образа жизни самки используют зрительные, слуховые или ольфакторные анализаторы при выборе полового партнера [2, 4].

У видов, населяющих большие территории и не имеющих постоянных частых встреч с конспецификами, основой коммуникации часто являются хемосигналы, состоящие из летучих и нелетучих соединений. Хемосигналы рассматриваются как наиболее древняя и широко распространенная форма

межполового взаимодействия практически всех таксонов животных [5]. У грызунов ведущую роль в дистантной оценке территориальных соперников, а также в оценке потенциальных брачных партнеров, играют запаховые метки. По запаху конспецифика грызуны способны определить его пол, возраст, генетический фон, диету, социальный и репродуктивный статус, а также физиологическое состояние [2, 6–10].

Способность к распознаванию и избеганию зараженных особей играет ключевую роль в механизмах поведенческой защиты от инфекций, которые направлены на ограничение контактов, включая и половые взаимодействия, между больными и здоровыми животными [11]. Многочисленные исследования показали, что грызуны могут определить

по запаху заражённого конспецифика [1, 6, 8, 11–13]. При этом, несмотря на паразит-зависимое разнообразие клинических проявлений иммунизации, у самцов мышей, зараженных разными видами гельминтов [12], бактериями [6] и вирусом гриппа [1], наблюдается однонаправленное снижение ольфакторной привлекательности. По всей видимости, в основе данного явления лежат изменения в организме, связанные с работой иммунной системы.

Оказалось, что активация защитных функций организма тимус-зависимыми антигенами является достаточным условием для изменения хемосигналов грызунов [14]. Например, введение эритроцитов барана приводит к снижению половой привлекательности загрязненной подстилки самцов мышей и джунгарских хомячков [13, 15]. Активация врожденного или приобретенного иммунного ответа у самцов мышей или крыс снижает привлекательность их мочи для половозрелых самок, предупреждая их о заболевании [14, 15, 16].

Иммунный ответ развивается с течением времени, и его влияние на хемосигналы животных также не остается постоянным. Хемосигналы иммунизированных самцов меняются на 3-и сутки после введения чужеродного антигена, что совпадает с началом продукции антител [15, 16]. Значительное снижение запаховой привлекательности иммунизированных самцов происходит при обнаружении интенсивной пролиферации специфических клонов В-лимфоцитов [17]. Это период, когда в иммунный ответ вкладывается наибольшее количество метаболических ресурсов [18]. Развитие иммунного ответа связано с выработкой как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Показано, что провоспалительные цитокины преобладают в первые 1–3 дня иммунного ответа, а наработка противовоспалительных цитокинов начинает увеличиваться в последующие дни [19]. Внутрибрюшинное и внутрижелудочковое введение бактериального липополисахарида (ЛПС), а также провоспалительно-го цитокина IL-1 β (цитокин Th1) приводит к снижению привлекательности запаха у крыс-самцов, но эффект ЛПС можно устранить внутрижелудочковой инъекцией противовоспалительного цитокина (Th2) — IL-10 [8].

Среди десятков работ, касающихся изучения запаховых различий между животными с разными генотипами, существует не так много работ, относящихся к поиску летучих маркёров физиологического состояния животных. На данный момент изучены различия, связанные с половым созреванием, стрессом, особенностями суточного ритма и влиянием диеты с высоким содержанием жиров [7, 20]. Эти работы демонстрируют, что летучие вещества, содержащиеся в моче мышей, отражают практически любые изменения в состоянии организма.

Летучие органические соединения в моче определяют привлекательность запаха [9, 21, 22] и различаются у животных с разными генами МНС [2, 20]. Также было показано, что воспаления различной этиологии наиболее сильно влияют на спектр ЛОС у людей [23, 24]. Все эти данные позволяют предположить, что генетически разные организмы с разными типами иммунных реакций будут различаться по профилю ЛОС и привлекательности для конспецификов, независимо от типа используемого антигена.

Иммунный ответ значительно варьируется у разных особей в том числе из-за преобладания либо Th1, клеточно-опосредованного иммунного ответа, либо Th2, гуморального ответа [25]. Чтобы учесть различия Th1 и Th2 в иммунном ответе, мы исследовали изменения ЛОС в моче и запаховую привлекательность на фоне антигенной стимуляции введением KLH у самцов инбредной линии мышей C57BL/6, которая характеризуется преимущественно Th1 типом иммунного реагирования, и инбредной линии BALB/c, у которой показано преобладание Th2 пути [26]. Для иммунизации был выбран гемоцианин улитки (KLH) — антиген, обычно используемый в качестве нереплицируемого активатора гуморального иммунного ответа у млекопитающих и птиц [14, 27].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и условия содержания

Исследованные животные, свободные от видоспецифичных патогенов (SPF-статуса), были рождены, выращены и на протяжении всего эксперимента содержались в SPF-виварии Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (RFMEFI62119X0023). Инбредные мыши C57BL/6 (52 самок, 20 самцов) и BALB/c (55 самок, 19 самцов) в возрасте 8–10 недель к началу исследования, содержались группами по 3 особи в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice, Animal Care, США), со свободным доступом к воде и гранулированному корму для лабораторных грызунов. В комнатах содержания поддерживали искусственный фотопериод 14C:10T, температуру 22–24°C и относительную влажность 30–70%. В качестве подстилочного материала использовали брезовые гранулы. Корм и подстилочный материал поступали к животным после стерилизации методом автоклавирования при температуре 121°C. Воду очищали при помощи фильтрационной системы Millipore. Загрязненную подстилку из клеток самцов ежедневно добавляли в клетки самкам той же линии, для поддержания устойчивых эстральных циклов.

Иммунизация и сбор образцов мочи

Мочу собирали у интактных самцов обеих линий через 6 ч после начала световой фазы. Сразу после сбора мочи животным внутрибрюшинно вводили либо 50 мкг гемоцианина (KLH — Keyhole Limpet Hemocyanin, Sigma), либо физиологический раствор (контроль). Через 3 дня после инъекции был взят еще один образец мочи. Самцов помещали на чашку Петри, выделение мочи при отсутствии мочеиспускания стимулировали путем поглаживания в нижней части живота. Все собранные образцы незамедлительно замораживали и хранили при температуре -80°C в течение 4–6 недель до последующего тестирования.

Газовая хроматография и масс-спектрометрия образцов мочи

Хромато-масс-спектрометрическим анализом исследовали 20 проб мочи (по 5 самцов каждой линии до и после иммунизации) и 8 проб воздуха в помещении. Для концентрирования пробы использовали трубку — концентратор из нержавеющей стали с сорбентом Tenax TA. Пробу объемом 20 мкл переносили в стеклянную вials, объемом 4 мл и продували аргоном с объемной скоростью 40 мл/мин при температуре 60°C . Поток аргона с парами пробы через кварцевый капилляр подавался в трубку-концентратор, где происходила адсорбция компонентов пробы на сорбенте концентратора. Время адсорбции — 20 мин. Температура сорбции — 25°C . Для ввода пробы в хроматографическую колонку использовали термодесорбер UNITY Series2 (Markes), температура десорбции — 250°C . Для анализа проб воздуха через сорбционную трубку при помощи воздушного аспиратора продували воздух со скоростью 40 мл/мин в течение 20 мин.

Хроматографирование проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A GC с колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщиной пленки неподвижной жидкой фазы (5% — дифенилполисилоксан, 95% — диметилполисилоксан) 0.25 мм. Условия: 3 мин при температуре 40°C , затем повышение температуры со скоростью $7^{\circ}/\text{мин}$ до 250°C . Хроматограммы записывали в режиме полного ионного тока в диапазоне масс 30 — 500. В качестве детектора использовали масс-спектрометр Agilent 7000 Series Triple Quadrupole GC/MS. Полученные масс-спектры веществ сопоставляли с базой данных NIST08 программой библиотечного поиска MassHunter.

Поведенческое тестирование

Тестируемую мочу самцов размораживали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее подготавливали стимул: 20 мкл мочи наносили на

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

За сутки до тестирования самок рассаживали индивидуально. При тестировании стимул помещали в угол домашней клетки животного, на расстоянии по 5 см от ближайших стенок, закрепляя прищепками на крышке клетки таким образом, чтобы мышь могла дотянуться до кончика пипетки для обнюхивания. Тестирование проводили в течение 10 мин, в темную фазу при красном освещении, результаты записывали на видеокамеру. Каждый стимул предъявляли трем разным самкам для увеличения надежности получаемых статистических данных. Каждая самка получила только один образец и участвовала в тестировании только один раз. Видеозаписи анализировали при помощи авторской программы, отмечая время и количество актов обнюхивания образца, груминга и рытья подстилки.

Сразу после каждого ольфакторного тестирования у самок определяли стадию эстрального цикла [28], так как известно, что стадия цикла самки может оказать влияние на её поведение в ольфакторных тестах [3]. Полученные данные центрировали, вычитая из времени обнюхивания каждой самки среднegrupповое значение времени обнюхивания, рассчитанное для каждой из 4-х стадий цикла и прибавляя среднее, рассчитанное без учета стадии цикла. Аналогичное преобразование проводили для груминга и рытья подстилки.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных был выполнен с использованием пакета STATISTICA 6.0. Для выбора используемых статистических методов устанавливали нормальность распределения признаков по критерию Колмогорова–Смирнова. Все полученные в исследовании зависимые переменные оказались нормально распределенными. Равенство дисперсий анализировали с помощью критерия Левене, который показал однородность дисперсий для величин пиков химических соединений ($p > 0.05$). Самки двух линий достоверно отличались по дисперсии поведенческих признаков (время обнюхивания, рытья подстилки и груминга), тогда как внутри линий дисперсия исследованных групп не различались.

Относительное содержание ЛОС в пробах мочи и воздухе лабораторного помещения сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента. Изменения в со-

держании отдельных компонентов анализировали при помощи дисперсионного анализа с повторными измерениями (ANOVA Repeated measures). Для интегральной характеристики паттернов ЛОС число исходных переменных было уменьшено с помощью дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов (PLS DA), который широко используется в биологических и медицинских исследованиях, поскольку позволяет максимизировать разделение между группами наблюдения [29]. PLS DA строит модель линейной регрессии, проецируя переменные в новое пространство, где Y является категориальной переменной [30]. Затем проводили двухфакторный дисперсионный анализ со значениями Y в качестве зависимой переменной, чтобы оценить распределение экспериментальных групп в пространстве осей.

Для анализа результатов поведенческого тестирования использовали двухфакторный дисперсионный анализ, с факторами «генотип» и «иммунизация». Апостериорные сравнения проводили при помощи критерия Тьюки (HSD-test). Поскольку количество и продолжительность поведенческих актов достоверно коррелировали друг с другом (обнюхивание $r = 0.85$, $p < 0.001$; груминг $r = 0.67$, $p < 0.001$; рытье подстилки $r = 0.94$, $p < 0.001$), в последующем анализе использовали только продолжительность данных актов. Для оценки взаимосвязей между изучаемыми признаками использовали коэффициент корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Поведенческая дискриминация
стимулов от контрольных
и антиген-стимулированных самцов*

Двухфакторный дисперсионный анализ данных ольфакторного теста показал, что реакции самок мышей BALB/c значительно отличались от самок мышей C57BL/6 по всем трем параметрам поведения, оцененным в ольфакторном тесте (табл. 1).

Самки линии BALB/c тратили больше времени на обнюхивание обонятельного стимула, чем C57BL/6 (рис. 1). Однако самки C57BL/6 демонстрировали более продолжительное копание и груминг по сравнению с самками мышей BALB/c. При этом иммунный статус самца, от которого был получен образец мочи, достоверно влиял на продолжительность обнюхивания стимула самками BALB/c ($p = 0.026$, HSD-тест): самки тратили меньше времени на обнюхивание обонятельных стимулов от иммунизированных самцов, чем от контрольных самцов (рис. 1). В то же время иммунный статус самца достоверно влиял на продолжительность груминга у самок линии C57BL/6 ($p = 0.030$, HSD-тест): самки тратили меньше времени на груминг в тестах со стимулом от иммунизированных самцов (рис. 1). Взаимодействие линии и иммунного статуса не оказалось статистически значимым ни по одному из изученных признаков (табл. 1).

*Изменение летучих компонентов после
иммунизации*

В отдельных пробах мочи было выявлено от 34 до 55 ЛОС (рис. 2), многие из них присутствовали также в пробах воздуха лабораторных помещений как летучие продукты метаболизма мышей и человека. Поэтому дальнейший анализ проводился только для ЛОС, уровни которых были значимо выше, чем в контрольных пробах воздуха ($p < 0.05$, t-критерий Стьюдента). Тридцать таких соединений были идентифицированы для использования при анализе ЛОС в многомерном пространстве с помощью PLS DA. Площади пиков отдельных ЛОС рассчитывали, как процент от общей площади пиков всех 30 соединений.

Анализ распределения индивидуальных значений в многомерном пространстве по осям Y1 и Y2 показал неперекрывающиеся облака ЛОС мочи самцов линий BALB/c и C57BL/6 (рис. 3). Облака иммунизированных и неиммунизированных самцов перекрывались, но были выявлены значимые влияния факторов линии и иммунизации на

Таблица 1. Влияние на поведение самок генотипа и иммунного статуса донора мочи (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA)

	Время обнюхивания		Время рытья подстилки		Время груминга	
	F _(1,103)	p	F _(1,103)	p	F _(1,103)	p
Линия	102.58	< 0.001	10.27	0.002	9.74	0.002
Иммунный статус самца — донора мочи	5.65	0.019	0.65	0.421	7.66	0.007
Взаимодействие факторов	1.92	0.097	0.84	0.362	1.48	0.227

Примечание: жирным выделены достоверные отличия при $p < 0.05$.

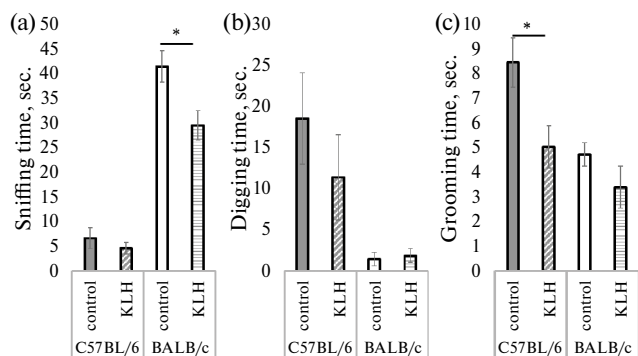


Рис. 1. Поведенческие реакции на запах мочи контрольных и антиген-стимулированных самцов (KLH) у самок линий BALB/c ($n = 37$ и $n = 18$, соответственно) и C57BL/6 ($n = 33$ и $n = 19$, соответственно): (a) — время обнюхивания, (b) — время рытья подстилки, (c) — время груминга. * — $p < 0,05$ по сравнению с реакцией на мочу контрольных самцов, HSD-test.

средние значения координат осей Y1 и Y2, используя двухфакторный дисперсионный анализ. Для оси Y1 наблюдалось значимое влияние генотипа ($F_{(1,16)} = 15.8, p = 0.001$) и иммунизации ($F_{(1,16)} = 11.3, p = 0.004$). Для оси Y2 также наблюдалось значимое влияние генотипа ($F_{(1,16)} = 17.79, p < 0.001$) и иммунизации ($F_{(1,16)} = 11.06, p = 0.004$). Взаимодействия не были значимыми ни для оси Y1 ($F_{(1,16)} = 0.02, p = 0.890$), ни для оси Y2 ($F_{(1,16)} = 0.69, p = 0.420$).

Таким образом, используя данный метод анализа, мы наблюдаем однонаправленное достоверное изменение компонентного состава мочи самцов при иммунизации как линии C57BL/6, так и BALB/c. Выбранная математическая модель позволяет дискриминировать образцы на основе запаха всей смеси в целом.

Анализируя изменение каждого отдельного пика в отдельности, из 30 соединений мы наблюдали достоверное увеличение относительных концентраций 4 ЛОС: 1) нонанала, 2) 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазола (SBT), 3) [1,4,5]-оксидиэпана и 4) бензотиазола у самцов мышей обеих исследуемых линий через 3 дня после иммунизации (табл.2, рис. 4).

Содержание феромона SBT было выше в моче контрольных самцов линии C57BL/6 по сравнению с мочой самцов линии BALB/c. После иммунизации данное соотношение сохранялось (табл. 2). Индивидуальные реакции каждого животного на иммунизацию приведены на рис. 4.

Содержание всех 4 летучих компонентов мочи одинаково возрастало у животных обеих исследуемых линий после иммунизации. Среди остальных проанализированных ЛОС не было зафиксировано достоверно снижающихся или изменяющихся только у самцов одной из линий.

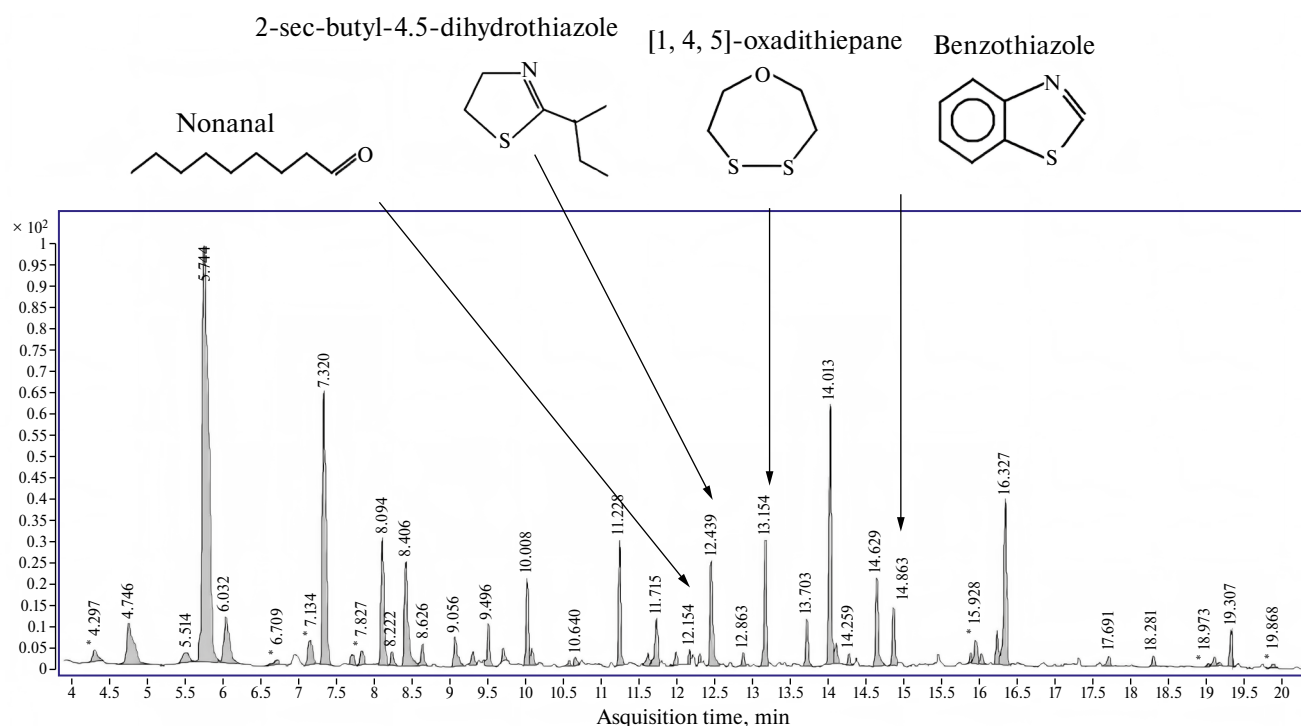


Рис. 2. Пример хроматограммы ГХ-МС контрольного самца линии BALB/c. Высота пиков, указанных выше четырех летучих органических соединений, значительно увеличивается у иммунизированных животных по сравнению с контрольными образцами.

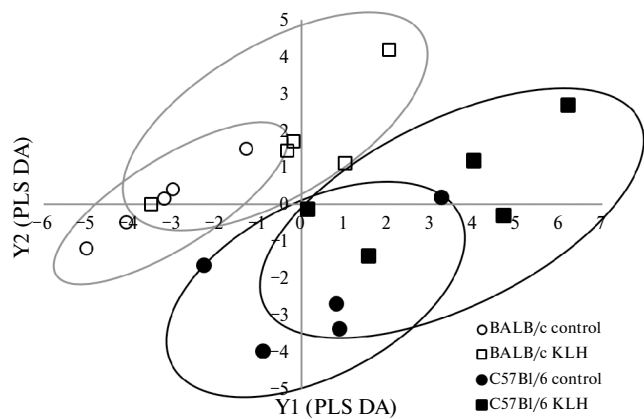


Рис. 3. Распределение отдельных паттернов ЛОС в пространстве осей Y1 и Y2 (PLS DA). Точки представляют самцов мышей линий C57BL/6 и BALB/c до (контроль) и через 3 дня после (KLH) введения антигена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Иммунизация вызывает значительные изменения в профилях ЛОС мочи самцов мышей. Поиск различий в многомерном пространстве при помощи PLS DA дает неперекрывающиеся облака для двух линий. Однако, эти облака все же перекрываются для иммунизированных и неиммунизированных мышей, тем не менее, для самцов обеих исследуемых линий этот сдвиг оказывается достоверным и однонаправленным. Анализ изменения отдельных хроматографических пиков показывает статистически значимое повышение содержания четырех ЛОС (нонаналь, 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол, [1,4,5]-оксидитиозпан, бензотиазол), происходящее на третий день после иммунизации. Эти изменения также оказались однонаправленными — мы зарегистрировали увеличение каждого из 4 компонентов как у самцов мышей линии BALB/c, так и C57BL/6. При этом не было зарегистрировано отдельных соединений, содержание которых менялось бы у одной из линий и не изменялось у другой. Следовательно, изменения в экскреции зарегистрированных ЛОС протекают по одной и той же закономерности как у

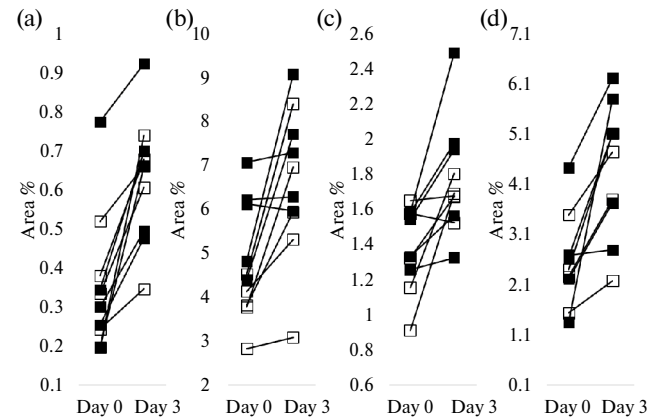


Рис. 4. Изменения относительных концентраций 4 соединений в моче иммунизированных самцов. Черные квадраты — самцы C57BL/6, белые квадраты — самцы BALB/c. (a) — Нонаналь, (b) — 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол, (c) — [1,4,5]-оксидитиозпан, (d) — Бензотиазол.

мышей C57BL/6, характеризующихся преобладанием клеточного (Th1) иммунного ответа, так и у мышей BALB/c, характеризующихся преобладанием гуморального (Th2) иммунного ответа [25, 26]. Хотя механизмы, объясняющие наблюдаемые изменения, требуют дальнейшего изучения профиля ЛОС, наши результаты подчеркивают, что активация иммунной реакции оказывает множественное влияние на обмен веществ, в том числе на состав выделяемых метаболитов, которые могут служить как диагностическими маркерами заболеваний [23, 24], так и индикаторами иммунного статуса, которые могут распознаваться другими животными [16]. Причем эти изменения носят однонаправленный характер независимо от преобладания типа иммунного реагирования, по крайней мере, на третьи сутки после иммунизации.

Три из четырех перечисленных выше ЛОС могут иметь сигнальное значение для мышей. В частности, 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол (SBT) является половым феромоном самцов мышей [31-33]. Интересно, что в ранних исследованиях SBT был

Таблица 2. Влияние на содержание отдельных ЛОС генотипа и иммунного статуса донора мочи (ANOVA Repeated measures)

	Нонаналь		SBT		[1,4,5] Оксидитиозпан		Бензотиазол	
	F _(1,8)	p	F _(1,8)	p	F _(1,8)	p	F _(1,8)	p
Линия	0.17	0.690	6.90	0.030	1.25	0.295	0.73	0.419
Иммунизация	32.06	0.000	10.34	0.012	12.03	0.008	20.96	0.002
Взаимодействие факторов	0.00	0.959	0.27	0.618	0.05	0.824	0.45	0.521

Примечание: жирным выделены достоверные отличия при p < 0.05.

обнаружен как половой феромон, привлекающий половозрелых самок. Однако этот эффект был показан при связывании SBT с основными белками мочи и возможностью прямого контакта с образцом в ольфакторных тестах. Комплекс SBT с белком-носителем достигает обонятельных рецепторов при прямом контакте носа мыши с грязной подстилкой или мочевого меткой, вызывая положительную реакцию [31]. При этом показано воздействие свободного SBT как феромона тревоги [34]. Будучи летучим соединением, он распознается нейронами ганглия Грюнберга, расположенного непосредственно у входа в полость носа. Активация этих нейронов запускает врожденное поведение страха у мышей обоих полов [34, 35]. В проведенных нами тестированиях была зафиксирована реакция мышей именно на летучие соединения.

Нонаналь ранее уже был показан как диагностический маркер развития различных заболеваний. Зафиксировано увеличение его экскреции при лейшманиозе [36], инфицировании плазмодием [37], при заболевании COVID-19 [38], развитии рака [37] и диабетических нарушениях [39]. Также нонаналь был зафиксирован в моче самок мышей, причем, только в стадии метэструса, что снижало привлекательность такой мочи для самцов [40].

Бензотиазол и его производные используются в качестве предшественников фармакологических средств нейропротекторного, антибактериального, противоаллергического, иммунодепрессивного и противовирусного действия. Показано воздействие некоторых производных бензотиазола на развитие иммунологических реакций, в том числе синтез цитокинов и пролиферацию Т-клеток иммунной системы [41]. Также показано негативное влияние бензотиазола на уровень андрогенов [42], что опосредованно может снижать привлекательность особей с повышенным содержанием бензотиазола в моче.

Однако, не стоит упускать из виду возможный механизм комплексного восприятия запаха, при котором реакция реципиента зависит не столько от содержания конкретных отдельных компонентов, сколько от относительного содержания их групп [7, 20]. Общая композиция всех 30 исследованных соединений также отличалась у иммунизированных и контрольных самцов в нашем исследовании.

Как и наблюдалось в предыдущих тестах бинарного выбора, проведенных для аутбредных линий мышей [6, 14], самки BALB/c в нашем исследовании тратили меньше времени на обнюхивание образцов мочи, собранных у иммунизированных самцов на 3-й день, по сравнению с образцами, контрольных животных. При этом мы не наблюдали снижения времени обнюхивания образца у самок C57BL/6. Известно, что мыши исследуемых линий существенно различаются по чувствительности

к запаховым стимулам: мыши линии C57BL/6 на два порядка слабее реагировали на предъявляемые запахи, чем мыши линии BALB/c [43]. В нашей работе зафиксирован значительно меньший интерес к обнюхиванию стимула самками линии C57BL/6: среднее время обнюхивания было меньше на порядок и не была зарегистрирована дискриминация по этому показателю образцов мочи контрольных и антигенстимулированных самцов, для которых была обнаружена разница в компонентном составе. Тем не менее, самки линии C57BL/6 характеризовались большим, чем самки BALB/c временем, затраченным на груминг и рытье подстилки. При этом было обнаружено достоверно меньшее время груминга в тестах с мочой иммунизированных самцов. Известно, что груминг в ольфакторном тестировании мочи конспецифика противоположного пола отражает интерес к потенциальному взаимодействию [44, 45]. Так самцы демонстрировали большую продолжительность груминга в тестах с мочой эстральных самок, а при кастрации время груминга значительно снижалось независимо от типа стимула [44]. Самки C57BL/6 также распознали иммунизированных самцов, но их реакция была выражена другим типом поведения.

Таким образом, наши данные подтверждают предыдущие исследования, показавшие, что у мышей на начальных этапах антителообразования, т.е. на 3-и сутки после введения чужеродного антигена, наблюдается поведенческая дискриминация между контрольными и иммунизированными обонятельными раздражителями. При этом различное восприятие запахов контрольных и иммунизированных самцов взрослыми самками имеет химическую основу. Установлены статистически значимые различия между мочой контрольных и иммунизированных самцов мышей по общей композиции ЛОС и общим уровням 4 из этих соединений, изменяющихся однонаправленно независимо от типа иммунного реагирования у мышей разных линий.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г. — Directive 2010/63/EU) и одобрено межинститутской биоэтической комиссией Института Цитологии и Генетики СО РАН (протокол 8 от 19.03.2012 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-14-00179.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием животных ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддерживаемых в рамках бюджетного проекта № FWNR-2022-0004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Penn D, Potts WK (1998) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends Ecol Evol* 13: 391–396. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01473-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01473-6)
2. Penn DJ (2002) The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology* 108: 1–21. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2002.00768.x>
3. Koyama S (2016) Primer Effects by Murine Pheromone Signaling: Pheromonal Influences on Reproductive Conditions. Springer.
4. Dougherty LR (2020) Designing mate choice experiments. *Biol Rev* 95: 759–781. <https://doi.org/10.1111/brv.12586>
5. Thom MD, Stockley P, Jury F, Ollier WE, Beynon RJ, Hurst JL (2008) The direct assessment of genetic heterozygosity through scent in the mouse. *Cur Biol* 18: 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.056>
6. Zala SM, Bilak A, Perkins M, Potts WK, Penn DJ (2015) Female house mice initially shun infected males, but do not avoid mating with them. *Behav Ecol Sociobiol* 69: 715–722. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-1884-2>
7. Schaefer ML, Wongravee K, Holmboe ME, Heinrich NM, Dixon SJ, Zeskind JE, Kulaga HM, Brereton RG, Reed RR, Trevejo JM (2010) Mouse urinary biomarkers provide signatures of maturation, diet, stress level, and diurnal rhythm. *Chemical Senses* 35: 459–471. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq032>
8. Arakawa H, Arakawa K, Deak T (2010) Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: A role for inflammatory processes. *Horm Behav* 57: 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.002>
9. Roberts SA, Prescott MC, Davidson AJ, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL (2018) Individual odour signatures that mice learn are shaped by involatile major urinary proteins (MUPs). *BMC biology* 16: 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0512-9>
10. Khotkina AS, Zavjalov EL, Shnayder EP, Gerlinskaya LA, Maslennikova SO, Petrovskii DV, Baldin MN, Makas AL, Gruzov VM, Troshkov ML, Moshkin MP (2023) CD-1 mice females recognize male reproductive success via volatile organic compounds in urine. *Vavilov J Genetic Breed* 27: 480–487. <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-58>
11. Beltran-Bech S, Richard FJ (2014) Impact of infection on mate choice. *Animal Behaviour* 90: 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.01.026>
12. Kavaliers M, Colwell DD (1995) Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc Royal Soc London. Ser B: Biol Sci* 261: 31–35. <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0113>
13. Новиков ЕА, Петровский ДВ, Кондратьев ЕЮ, Литвинова ЕА, Мошкин МП (2004) Поведение самцов джунгарского хомячка, *phodopus sungorus* (rodentia, muridae), при прямом или ольфакторном контактах с антиген-стимулированными особями. *Зоол журн* 83: 486–492. [Novikov EA, Petrovskij DV, Kondratyuk EYu, Litvinova EA, Moshkin MP (2004) Povedenie samcov dzhungarskogo homyachka, *phodopus sungorus* (rodentia, muridae), pri pryamom ili ol'faktornom kontaktah s antigenstimulirovannymi osobyami. *Zool Zhurn* 83: 486–492. (In Russ)].
14. Gerlinskaya LA, Shnayder EP, Dotsenko AS, Maslennikova SO, Zavjalov EL, Moshkin MP (2012) Antigen-induced changes in odor attractiveness and reproductive output in male mice. *Brain Behav Immun* 26: 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.11.010>
15. Akulov AE, Petrovskii DV, Moshkin MP (2009) Antigen stimulation modifies social behavior and chemosignals in male laboratory mice. *Zhurn Vyshei Nervn Deiat Im IP Pavlova* 59: 335–343.
16. Arakawa H, Arakawa K, Deak T (2009) Acute illness induces the release of aversive odor cues from adult, but not prepubertal, male rats and suppresses social investigation by conspecifics. *Behav Neurosci* 123: 964–978. <https://doi.org/10.1037/a0017114>
17. Conger JD, Lewis GK, Goodman JW (1981) Idiotypic profile of an immune response. I. Contrasts in idiotypic dominance between primary and secondary responses and between IgM and IgG plaque-forming cells. *J Exp Med* 153: 1173–1186. <https://doi.org/10.1084/jem.153.5.1173>
18. Romanyukha, AA, Rudnev, SG, Sidorov IA (2006) Energy cost of infection burden: An approach to understanding the dynamics of host–pathogen interactions. *J Theor Biol* 241: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.11.004>
19. Zawislak C, Beaulieu A, Loeba G, Karoa J, Cannara D, Bezman N, Lanier L, Rudenskaya A, Suna J (2013) Stage-specific regulation of natural killer cell homeostasis and response against viral infection by microRNA-155. *Proc Nat Acad Sci* 110: 6967–6972. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304410110>
20. Novotny MV, Soini HA, Koyama S, Wiesler D, Bruce KE, Penn DJ (2007) Chemical identification of MHC-influenced volatile compounds in mouse urine. I: Quantitative proportions of major chemosignals. *J Chem Ecol* 33: 417–434. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9230-9>

21. *Luzynski KC, Nicolakis D, Marconi MA, Zala SM, Kwak J, Penn DJ* (2021) Pheromones that correlate with reproductive success in competitive conditions. *Sci Rep* 11: 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01507-9>
22. *Penn DJ, Zala SM, Luzynski KC* (2022) Regulation of sexually dimorphic expression of major urinary proteins. *Front Physiol* 13: 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.822073>
23. *Miekisch W, Schubert J, Noeldge-Schomburg G* (2004) Diagnostic potential of breath analysis — focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta* 347: 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.04.023>
24. *Boots AW, Berkel JJ, Dallinga JW, Smolinska A, Wouters EF, Schooten FJ* (2012) The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. *J Breath Res* 6: 1–22. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/6/2/027108>
25. *Mejri N, Francini N, Rutti B, Brossard M* (2001) Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol* 23: 61–69. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00356.x>
26. *Darville T, Andrews Jr CW, Sikes JD, Fraley PL, Braswell L, Rank RG* (2001) Mouse strain-dependent chemokine regulation of the genital tract T helper cell type 1 immune response. *Infection Immun* 69: 7419–7424. <https://doi.org/10.1128/iai.69.12.7419-7424.2001>
27. *Harris JR, Markl J* (1999) Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 30(6):597–623. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00036-0)
28. *Cora MC, Kooistra L, Travlos G* (2015) Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol* 43: 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
29. *Gromski PS, Muhamadali H, Ellis DI, Xu Y, Correa E, Turner ML, Goodacre R* (2015) A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytic Chim Acta* 879: 10–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>
30. *Brereton RG, Lloyd GR* (2014) Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J Chemometric* 28: 213–225. <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
31. *Jemiolo B, Harvey S, Novotny M* (1986) Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc Nat Acad Sci* 83: 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4576>
32. *Novotny MV, Ma W, Wiesler D, Zidek L* (1999) Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biol Sci* 266: 2017–2022. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0880>
33. *Liu YJ, Guo HF, Zhang JX, Zhang YH* (2017) Quantitative inheritance of volatile pheromones and darcin and their interaction in olfactory preferences of female mice. *Sci Rep* 7: 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02259-1>
34. *Brechbühl J, Moine F, Klaey M, Nenniger-Tosato M, Hurni N, Sporkert F, Giroud C, Broillet MC* (2013) Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *Proc Nat Acad Sci* 110: 4762–4767. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214249110>
35. *Bigdai EV, Samoilov VO, Sinegubov AA* (2021) The Mechanisms of Chemoreception and Thermoreception in the Grueneberg Ganglion. *Biophysics* 66: 91–97. <https://doi.org/10.1134/S0006350921010139>
36. *Magalhães-Junior JT, Mesquita PRR, Oliveira WFDS, Oliveira FS, Franke CR, Rodrigues FDM, Andrade JB, Barrouin-Melo SM* (2014) Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. *Analyt Bioanal Chem* 406: 6691–6700. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8103-2>
37. *Chai HC, Chua KH* (2021) The potential use of volatile biomarkers for malaria diagnosis. *Diagnostics* 11: 1–11. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122244>
38. *Berna AZ, Odom John AR* (2022) Breath metabolites to diagnose infection. *Clinical Chemistry* 68: 43–51. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab218>
39. *Holland ML, Rhodes GR, Wiesler D, Novotny M* (1984) Chromatographic profiling of urinary volatile and organic acid metabolites of normal and diabetic C57BL/Ks mice. *J Chromatograph B: Biomed Sci Appl* 306: 23–37. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)80866-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)80866-X)
40. *Achiraman S, Archunan G* (2006) 1-Iodo-2-methylundecane, a putative estrus-specific urinary chemo-signal of female mouse (*Mus musculus*). *Theriogenology* 66: 1913–1920. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.010>
41. *Khan KM, Mesaik MA, Abdalla OM, Rahim F, Soomro S, Halim SA, Mustafa G, Ambreen N, Khalid AS, Taha M, Perveen S, Alam MT, Hameed A, Ul-Haq Z, Ullah H, Rehman ZU, Siddiqui RA, Voelter W* (2016) The immunomodulation potential of the synthetic derivatives of benzothiazoles: Implications in immune system disorders through in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chem* 64: 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.11.004>
42. *Li Y, Cai Z, Li R, Leng P, Liu H, Liu J, Mahai G, Li Y, Xu S, Xia W* (2022) Associations of benzotriazoles and benzothiazoles with estrogens and androgens among pregnant women: a cohort study with repeated measurements. *Sci Total Environ* 838: 155998. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155998>
43. *Lee AW, Emsley JG, Brown RE, Hagg T* (2003) Marked differences in olfactory sensitivity and apparent speed of forebrain neuroblast migration in three inbred strains of mice. *Neuroscience* 118: 263–270. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00950-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00950-8)
44. *Achiraman S, Ganesh DS, Kannan S* (2014) Response of male mice to odours of female mice in different stages of oestrous cycle: Self-grooming behaviour and the effect of castration.
45. *Ferkin MH* (2018) Odor communication and mate choice in rodents. *Biology* 7: 1–18. <https://doi.org/10.3390/biology7010013>

IMMUNIZATION OF MALE BALB/C AND C57BL/6 MICE SIMILAR MODULATES CHEMICAL SIGNALS DETECTED IN BOTH CHROMATOGRAPHIC AND BEHAVIORAL TESTS

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

¹ *The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch
of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

² *The Federal Research Center Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch
Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

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

The odor plays a key role in communication between animals and the choice of a mate. The odor of urine of males becomes less attractive to mature females after infection or activation of the immune system. The development of the immune response in the early stages is related with the production of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. To investigate the chemical basis of the observed differences and examine the influence of female interactions with the odor of antigen-treated males, we immunized males of inbred BALB/c (Th1) and C57BL/6 (Th2) mice with hemocyanin (KLH). For females of both tested strains, the attraction of the odor of male urine collected 3 days after immunization was lower compared with the odor of control males. Herewith, BALB/c females sniffed the urine of immunized males less frequently, and C57BL/6 females demonstrated a shorter duration of grooming in olfactory tests with urine of immunized males. The altered response of females to the odor of male urine collected on day 3 after KLH injection matched with antigen-induced modulation of relative levels of volatile organic compounds (VOCs) detected in urine samples by gas chromatography and mass spectroscopy (GC-MS). In males of both strains, after KLH injection, an increase in the content of nonanal, benzothiazole, as well as 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole, and [1,4,5]-oxadithiepane was shown. At the same time, no compounds were found, the content of which changes in different directions in the urine of males after immunization, depending on the strain of the animal.

Keywords: Mice immunization, mating preference, urine odor, olfactory test, nonanal, benzothiazole, 2-sec-butyl-4,5-dihydro-thiazole, SBT

РАЗВИТИЕ КОЛОНИИ КАИРСКОЙ ИГЛИСТОЙ МЫШИ (*ACOMYS CAHIRINUS*) В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2024 г. П. Ю. Шкорбатова, А. А. Вещицкий, А. А. Михалкин, Н. И. Никитина,
А. В. Беляев, Н. С. Меркульева*

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

* e-mail: merkulyeva@infran.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024 г.

После доработки 19.06.2024 г.

Принята к публикации 19.06.2024 г.

Каирская иглистая мышь (*Acomys cahirinus*) — уникальная животная модель для изучения онтогенеза и регенерации. При этом особенности биологии этих животных, в частности, малоплодность, значительно затрудняют исследовательскую работу. Целью данной работы было изучение поведения и репродукции каирской иглистой мыши и создание репродуктивного ядра колонии в лабораторных условиях. В настоящей статье описаны особенности содержания каирских иглистых мышей и приёмы работы с ними, такие как оптимизация рациона и условий содержания, особенности хендлинга и маркировки, а также представлены некоторые репродуктивные показатели колонии. Мы оптимизировали условия содержания животных, модифицировав пищевой рацион иглистых мышей добавлением в него членистоногих — важного компонента естественного природного рациона, а также создав условия обогащённой среды (беговые колеса, тубусы, домики). Как итог, получен прирост поголовья животных более чем на 50% в течение 9 мес; общая выживаемость потомства составила 98%.

Ключевые слова: каирская иглистая мышь, *Acomys cahirinus*, условия содержания, репродукция, постнатальный рост животных

DOI: 10.31857/S0044452924040097, **EDN:** YPYBUI

ВВЕДЕНИЕ

Каирская иглистая мышь (*Acomys cahirinus*) — мелкий грызун, размером немного крупнее лабораторной мыши (вес взрослой особи составляет 40–65 г [1]), естественные условия проживания которого — Передняя Азия и Африка [2, 3]. Традиционно каирскую иглистую мышь относят к семейству Мышиные (*Muridae*), подсемейству Деомииновые (*Deomyiinae*) [4, 5]. Согласно ряду исследований, основанных на анализе моляров [6, 7], кариотипа [8], митохондриальных генов [9] и транскрипционных факторов поджелудочной железы [10], каирская иглистая мышь ближе к подсемейству *Gerbillinae*, чем к *Murinae*. Род *Acomys* включает несколько десятков видов, однако в качестве объекта исследований в области физиологии и анатомии было использовано лишь несколько из них: каирская иглистая мышь (*A. cahirinus*), золотистая иглистая мышь (*A. russatus*), арабская иглистая мышь (*A. dimidiatus*), капская иглистая мышь (*A. subspinosus*), южноафриканская иглистая мышь (*A. spinosissimus*), акомис Персиваля (*A. percivali*) и акомис Кемпа (*A. kempfi*) [1, 11–19]. При этом наиболее часто в лабо-

раторных исследованиях используется каирская иглистая мышь.

Виды иглистых мышей имеют сходный размер, но различаются цветом шерсти и расположением игольчатых волосков на теле [20]. У каирской иглистой мыши серо-коричневая спина и кремовое брюшко, игольчатые волоски покрывают спину от ее середины до основания хвоста; арабская иглистая мышь имеет сходное расположение игольчатых волосков и окрас, но несколько светлее, чем каирская [20] и более длинный хвост [21]. Тем не менее, ранее их рассматривали как подвида; однако на основании анализа строения черепа, моляров [21] и кариотипа [22] в настоящее время они считаются разными видами. У акомиса Кемпа более темная шерсть с красноватым оттенком и белое брюшко с игольчатыми волосками, акомис Персиваля имеет равномерный серый окрас спинки и белое брюшко, игольчатые волоски покрывают спину от шеи до основания хвоста [20]. Ареалы обитания разных видов иглистых мышей в природе различны, но у некоторых из них могут перекрываться [23, 24].

Общая продолжительность жизни иглистых мышей превышает таковую у лабораторной мыши и крысы и составляет 3–4 года, как в природе, так и в

лабораторных условиях [11, 20, 25–27]; есть данные, указывающие на более длительный срок жизни: до 6 лет [28]. Половая зрелость наступает в возрасте 2–3 месяца и сопровождается изменением окраски шерстного покрова с полностью серого на серо-золотистый и появлением характерной “взрослой” игольчатой шерсти на спине [20]. Исследований, посвященных различиям в биологии разных видов иглистых мышей, немного; в частности, показано, что золотистая иглистая мышь имеет более низкий уровень метаболизма по сравнению с каирской, и лучше переносит высокие температуры [24], а также может перестраиваться с ночного режима обитания на дневной [29].

Иглистые мыши обладают рядом биологических особенностей, благодаря чему её всё чаще используют в качестве лабораторного животного. Наиболее известной и изучаемой на настоящий момент особенностью иглистых мышей, отличающей их от других млекопитающих, является высокоразвитая способность к регенерации поврежденных тканей. Данная особенность определяет характерную для иглистой мыши способность к потере хвоста и участков кожи (псеводоаутономии) как способа защиты и избегания хищников [30]. Кожа иглистой мыши, даже при обширных повреждениях, полностью восстанавливается, включая поверхностные и глубокие слои, волосные фолликулы и кожные железы, без образования рубца, что показано на нескольких видах иглистых мышей: *A. cahirinus* [31, 32], *A. percivali* и *A. kempi* [33]. Высокая степень регенерации также обнаруживается при повреждении почек [34], скелетной [35] и сердечной [36] мускулатуры. После повреждения спинного мозга каирская иглистая мышь быстро восстанавливает локомоторные функции благодаря тому, что на месте травмы не формируется глиальный рубец [37, 38]. Всё это открывает широкие перспективы для использования данного животного в исследованиях для регенеративной медицины [20, 39, 40].

Иглистые мыши, в отличие от большинства представителей семейства мышиных, являются зрелорождающимися (*precocial*): детёныши появляются на свет покрытые шерстью, с открытыми глазами и сразу способны к самостоятельному передвижению. На 4-й день после рождения они начинают есть твердую пищу [26]. Иглистая мышь — малоплодный грызун: в помёте 1–5 детёнышей [41], по сравнению с 6–12 — у *Mus musculus* [42] и 8–16 — у *Rattus norvegicus domestica* [43], и имеют более длительный срок беременности (37–42 дня), чем незрелорождающиеся грызуны (мышь: 20 дней, крыса: 21–24 дня) [1]. Последнее позволяет использовать иглистых мышей в исследованиях длительного влияния внешних факторов на внутриутробное развитие [44]. Многие органы новорожденной иглистой

мышь значительно более развиты, по сравнению с таковыми у незрелорождающихся лабораторных грызунов: например, тонкий кишечник, поджелудочная железа [45], печень [46], почки [47]. Способность самостоятельно передвигаться сразу после рождения требует адекватной сенсомоторной координации, а значит, более зрелой нервной системы, чем у незрелорождающихся животных. Действительно, миелинизация нервных волокон головного мозга у новорожденной иглистой мыши значительно выше [48], а большинство структур мозга более зрелые, чем у новорожденных крысят и мышат (гиппокамп, зубчатая фасция, обонятельные луковицы, зрительная кора [12, 13, 49–51]).

Иглистая мышь — одно из немногих млекопитающих и единственный известный на данный момент грызун, имеющий не эстральный, но менструальный цикл [52]. Периодические изменения структуры эндометрия матки и уровня прогестерона в крови в соответствии с фазой менструального цикла предполагают возможность использования каирской иглистой мыши в качестве модели для изучения нарушений менструального цикла, предменструального синдрома [53] и менопаузы [54].

Каирская иглистая мышь имеет особенности строения (гиперплазию) островков Лангерганса поджелудочной железы [55, 56] и сниженную чувствительность синтеза проинсулина к глюкозе, по сравнению с крысами и мышами [57]. В случае кормления животных высококалорийным и жирным кормом, до 15% популяции склонны к развитию ожирения и диабета второго типа [56, 58]. Это позволяет использовать каирскую иглистую мышь в качестве животной модели при исследовании механизмов развития диабета [59], наряду с песчанками [60] и дегу [61].

Таким образом, каирская иглистая мышь является уникальной моделью для исследований в разных областях биологии и медицины. Однако её длительная беременность и малоплодность обуславливает медленный рост поголовья, а склонность к развитию диабета является источником дополнительных трудностей при её содержании. Таким образом, для возможности успешной реализации исследований на каирской иглистой мыши, необходимо оптимизировать условия их содержания и репродукции. В настоящей работе мы представляем особенности поддержания колонии каирской иглистой мыши в лабораторных условиях, включая особенности рациона питания и контроля репродукции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Колония каирской иглистой мыши создана на базе Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Ядро колонии — 24 особи *Acomys cahirinus* в возраст-

те 1–1.5 месяцев (14 самок и 10 самцов) — было закуплено в Федеральном Исследовательском Центре Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Общая выборка составила 136 животных: 10 взрослых самцов, 19 взрослых самок и 107 детёнышей разного возраста, при этом в количественный анализ по детёнышам вошли данные только от 58 из них (см. ниже). Наблюдения проводились в период с июля 2022 г. по январь 2024 г.

Содержание животных. Все животные содержались в одной комнате площадью 18 м², полностью изолированной от остальных помещений лаборатории. До 4-х месячного возраста животные содержались группами по 5–7 особей одного пола в полипропиленовых клетках для грызунов размером 545 × 395 × 200 мм с крышкой-решеткой (рис. 1а). Для получения потомства животные в количестве 1 самец и 1–3 самки были помещены в такие же клетки и содержались так до обнаружения беременности у самки или до родов. Одну часть беременных / родивших самок (n = 15) с помётом отсаживали от самца в отдельные клетки размером 160 × 270 × 340

мм, другую часть родивших самок (n = 4) с потомством оставляли с самцом, так как в литературе имеются указания, что групповое содержание нескольких поколений иглистых мышей в одной клетке является оптимальным для размножения и социальной активности этих животных [20, 41]. Различия между этими вариантами представлены в результатах.

В возрасте 1–1.5 месяцев детёнышей отсаживали от матерей и помещали в клетки по 5–7 особей одного пола. Пол детёнышей определяли сразу после рождения и затем повторно — при формировании однополых групп (рис. 1с).

Для создания обогащенной среды во все клетки помещали открытое беговое колесо для грызунов (диаметр 150 мм), прозрачный акриловый (длина 130 мм, диаметр 60 мм) и/или картонный (длина 240 мм, диаметр 45 мм) тубусы, картонные коробки-домики размером 150 × 150 × 45 (для больших клеток) или 120 × 120 × 120 (для маленьких клеток) (рис. 1а).

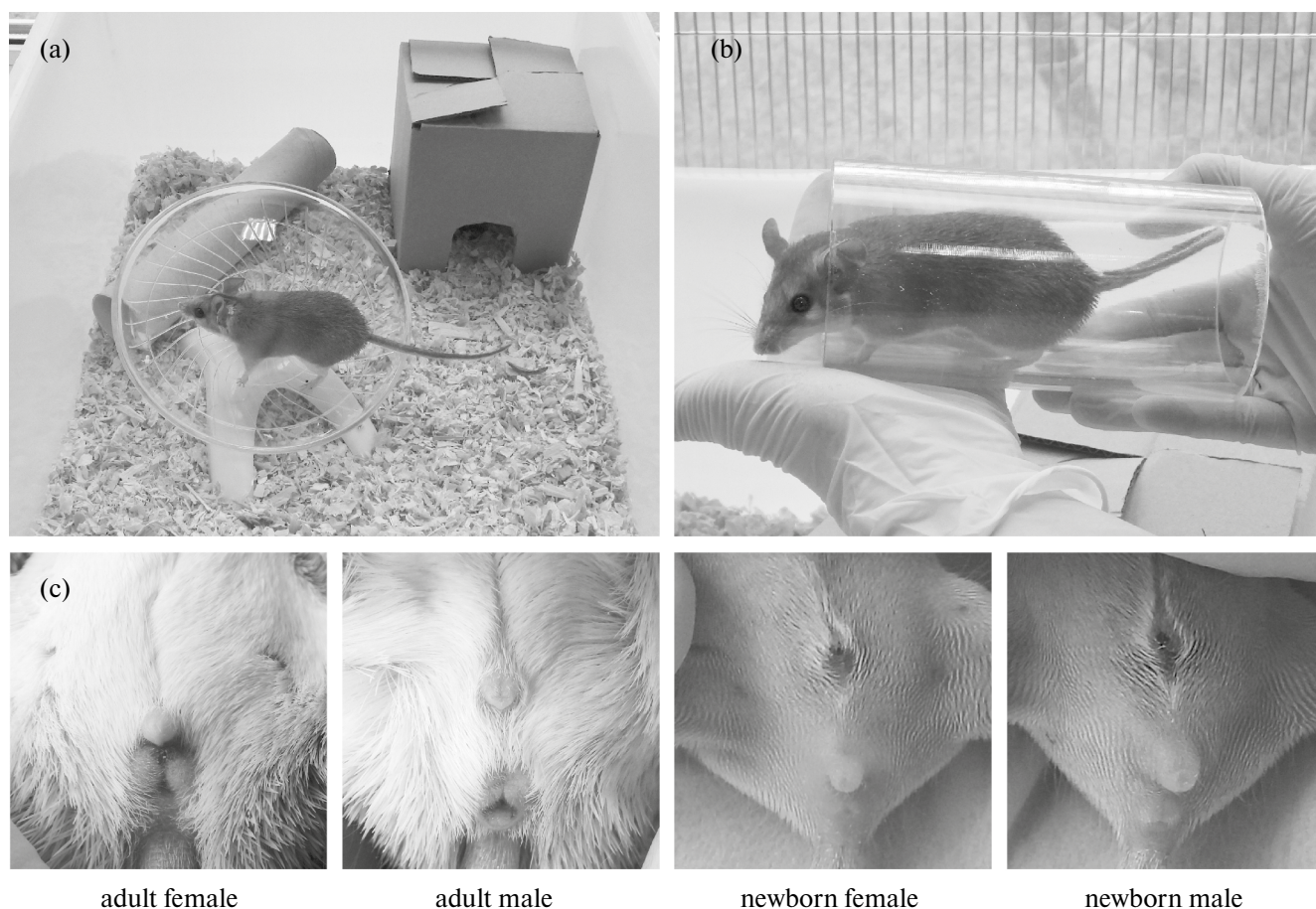


Рис. 1. Условия содержания и определение пола. (а) — Общий вид клетки и среды обитания. (б) — Хендлинг с помощью прозрачного тубуса. (с) — Определение пола у взрослых и новорожденных кайрских иглистых мышей.

В качестве подстила использовали опилки лиственных пород деревьев. Помещение вивария было освещено искусственно в режиме 12 ч свет: 12 ч темнота. Температура воздуха в помещении поддерживалась на уровне 24–25°C, влажность — на уровне 40–50%. Контроль температуры осуществлялся с помощью автоматической системы вентиляции и обогрева, контроль за уровнем влажности проводился в ручном режиме (использовали увлажнители воздуха). Для контроля помещение было оснащено электронным гигрометром-термометром.

Кормление. Рацион кормления состоял из корма для грызунов “Крысуна” в количестве 4 г в день / животное (состав: гранулы, содержащие семена злаковых и бобовых культур, натуральные компоненты животного и растительного происхождения, витаминно-минеральный комплекс, пробиотик и пребиотик; пшеница, просо, ячмень, овес, горох, чечевица, кукуруза, семена подсолнечника, плоды рожкового дерева, морковь, креветки цельные, воздушная пшеница, воздушная перловка, семена тыквы, арахис, кокос, банан). Каждый день животные также получали по 3 г свежей моркови или яблока. В каждой клетке был закреплен минеральный камень (производитель ООО “Зоомир”; состав: витамины группы В, А, D3, Е, энтеросорбент, измельченные раковины моллюсков, пивные дрожжи, кормовой мел, гипс, сапропель, соль поваренная йодированная). Помимо перечисленного, в рацион каирских иглистых мышей была введена смесь из сушёных членистоногих, в которую вошли: кузнечик, сверчок, мучной червь, американский таракан, львинка, зофобас, тутовый шелкопряд, в количестве 4 г в неделю. При составлении этой добавки мы руководствовались данными по естественному рациону каирских иглистых мышей, который был определён при анализе содержимого желудка у диких животных [15]; авторы отмечают, что в природе до 40% рациона каирских иглистых мышей составляют членистоногие [15, 62]. Дневную порцию корма на всех животных помещали в клетку ежедневно в стеклянной чашке Петри (для того, чтобы корм не смешивался с подстилом и можно было контролировать поедаемость корма). Общая питательная ценность рациона представлена в таблице 1. Для беременных и кормящих самок количество корма увеличивали. Вода была предоставлена *ad libitum*, в пластиковых бутылках-поилках для грызунов.

Взвешивание, хендлинг и маркировка. Взвешивание взрослого поголовья производилось еженедельно, а детёнышей — в возрасте от рождения до 1.5–2 месяцев — ежедневно. Для взвешивания использовали ювелирные весы (XY-8006, Pocket Scale, Китай) и прозрачный контейнер с крышкой. Также проводили приучение животных к рукам (хендлинг): в первый месяц после поступления — исключительно

Таблица 1. Питательная ценность рациона в расчете на 100 грамм корма и на 1 животное в сутки.

Питательная ценность	на 100 г корма	на 1 животное
Белки, г	11.90	0.90
Жиры, г	5.06	0.38
Углеводы, г	34.38	2.60
Калорийность, ккал	243.79	18.46

путём помещения их в прозрачные акриловые тубусы (рис. 1b); позже — также путем поглаживания животных, находящихся в клетке, по спине и голове, мягкой фиксацией в полотенце. Детёнышей, родившихся в нашей колонии, приучали к рукам с рождения.

Маркировку детёнышей проводили путем нанесения отметок перманентным маркером на хвост во время процедуры хендлинга и взвешивания 1 раз в 1–3 дня. В возрасте 21–25 дней животным татуировали пальцы и подушечки стоп, основываясь на схеме, представленной в [63] (рис. 2a, b). По причине быстрой и полной регенерации [64], для маркировки иглистых мышей не применяют перфорацию ушей, применение ушных бирок также невозможно, поскольку они отторгаются вместе с кожей [20]. Поэтому использование татуировок пальцев оказалось удобным способом маркировки каирских иглистых мышей.

Все перемещения животных из клетки в клетку, спаривания, количество и вес детёнышей, вес взрослых животных фиксировали в электронном журнале.

Статистика. При сравнении данных от разных животных использован критерий Манна–Уитни (одиночные сравнения) или Крускала–Уоллиса (множественные сравнения). При сравнении данных от одних и тех же животных использован парный критерий Уилкоксона. Для оценки зависимости между параметрами использован линейный коэффициент корреляции Пирсона. Уровень значимости: $p < 0.05$. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общие особенности поведения каирской иглистой мыши

Каирские иглистые мыши — достаточно пугливые животные. В первое время после приобретения они очень часто демонстрировали поведенческий акт в виде сальто назад. Известно, что появление стрессового агента увеличивает частоту таких сальто на порядок [65], и мы подтверждаем этот факт.

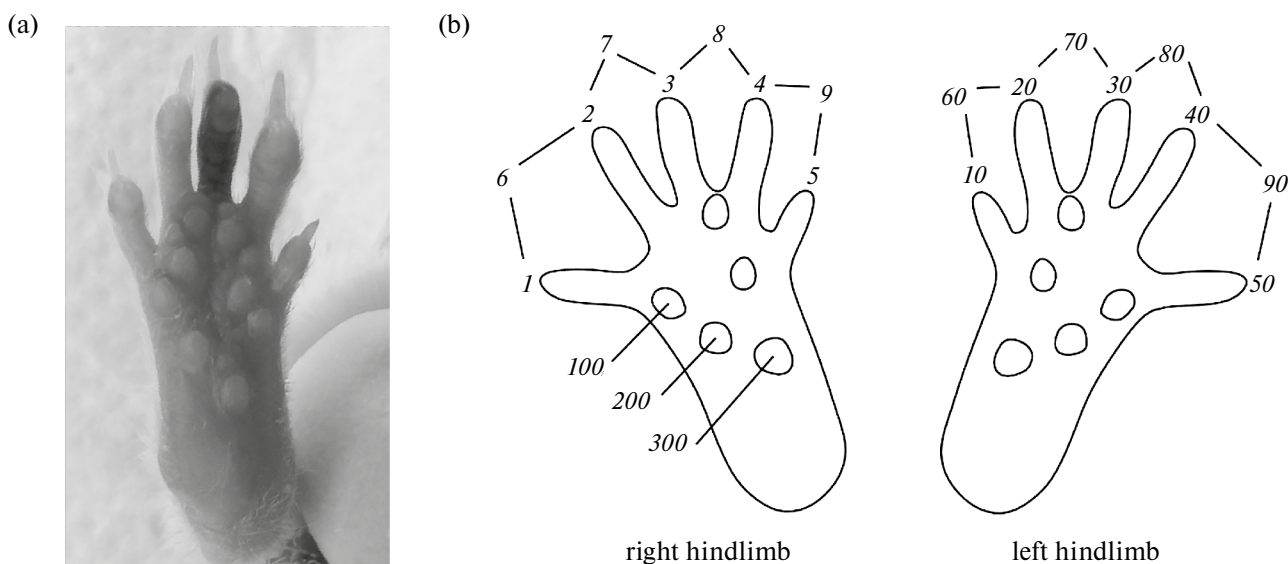


Рис. 2. Маркировка животных. (а) — Фото правой стопы каирской иглистой мыши с нанесенной татуировкой на 3-й палец (номер животного 3). (б) — Схема кодирования номеров животного: татуировки на правой лапе означают единицы, на левой — десятки; татуировки на подушечках правой стопы — сотни.

При этом ежедневный хендлинг постепенно снижал, а затем и полностью подавил эту форму поведения (примерно через 3 месяца после начала хендлинга). Некоторые самки в первые дни после родов демонстрируют подобное поведение во время взвешивания их детёнышей и уборки клеток, однако это явление кратковременное. Каирские иглистые мыши плохо приручаются, поэтому им необходим не периодический, но ежедневный хендлинг. Минимальным объемом хендлинга мы полагаем поглаживание животных по спине, прикосновение к ним во время уборки и кормления в течение 1–2 мин на клетку из 5–6 особей. Для животных, которых планируется задействовать в поведенческих экспериментах, необходим более продолжительный и интенсивный хендлинг, использование пищевого подкрепления. Следует отметить, что обычные способы взятия и фиксации грызунов за хвост или кожу спины не применимы к каирской иглистой мыши, поскольку они легко теряют часть кожи и хвост [20]. Использование прозрачных тубусов и контейнеров решает эту проблему; также показано, что такой способ хендлинга снижает тревожность у мышей [66]. При необходимости проведения осмотров, инъекций, а также татуировок фиксацию в полотенце мы считаем оптимальной и атравматичной. Для подобной фиксации животного накрывают полотенцем со спины, слегка зажимают с боков и переворачивают животом вверх, открывая необходимую для доступа часть тела: задние конечности — для внутримышечных инъекций или татуировок, живот — для внутрибрюшинных инъекций (рис. 3а). Если фиксацию проводит один оператор,

то он прижимает животное, завернутое в полотенце, предплечьем к столу, аналогично тому, как это описано в [67, 68] или к своему телу [69]; это освобождает кисти обеих рук для проведения манипуляций (рис. 3б, с). Подкожные инъекции в таком положении удобно проводить не в области холки, а в кожную складку в районе колена или на боку животного (рис 3д). При необходимости осмотра головы, мордочки или выпаивания, тело животного заворачивают в полотенце, оставляя голову снаружи (рис 3е).

Каирские иглистые мыши проводят значительную часть активного бодрствования на беговых колёсах: как в отсутствие, так и в присутствии наблюдателей. Отмечаем, что в ряде случаев быстрый бег на колесе отражает нервозность животного: например, при переносе клетки на стол для хендлинга и уборки. Животные сразу же забираются на беговое колесо после кратковременного (на период до суток) отлучения от него. Поэтому полагаем использование беговых колёс необходимым элементом в клетке этих животных. Каирской иглистой мыши, так же, как и другим грызунам, необходимо укрытие: картонный тубус или домик; при открывании клетки во время хендлинга или уборки они предпочитают прятаться в домике.

Хотя считается, что иглистые мыши в целом общительны и мало агрессивны [70, 71], они могут проявлять агрессию в отношении других особей, в том числе, детёнышей [41, 72, 73]. Результатом этого являются многочисленные покусывания на хвосте, загривке и ушах. В ряде случаев (в клетках с групповым содержанием, главным образом, самцов) мы



Рис. 3. Фиксация животного в полотенце (а) и последующее проведение рутинных процедур: (b) — внутримышечная инъекция в область голени, (c) — внутрибрюшинная инъекция, (d) — подкожная инъекция в складку на боку, (e) — выпаивание.

также отмечали полное или частичное скусывание хвостов. В однополых группах это, скорее всего, результат установления иерархических отношений [72, 74]. Показано, что, у иглистых мышей, в от-

личие от других грызунов, и самцы и самки могут одинаково активно проявлять агрессивное поведение (драки, погони) при содержании вместе особей одного пола [72–75], однако самки наносят менее

значительные повреждения соперникам [75]. В случае содержания вместе разнополых особей, чаще доминируют самки [72]. При длительном содержании животных вместе в половине случаев антагонистическое поведение прекращается, и определить иерархический статус животных не представляется возможным [74].

Репродукция каирской иглистой мыши

Беременность и роды. Поскольку у самок каирской иглистой мыши, в отличие от самок обычных мышей и крыс, после спаривания не образуется вагинальная пробка [26], беременность самки проще всего констатировать по набору веса. В литературе вес взрослых небеременных самок составляет 35–44 г

[26, 30], что соответствует данным по нашей колонии: 43.9 ± 1.2 г.

Беременность каирской иглистой мыши составляет 37–42 дня [1, 14, 20, 26, 41]. Мы оценивали приращение веса беременными самками на протяжении всего периода гестации. Как видно на рисунке 4а, иллюстрирующего индивидуальные кривые набора веса, наиболее выраженное приращение веса происходит с 4-ой недели. Усреднённые значения веса по группе указывают на достоверное приращение веса на сроке в 3 и 4 недели (48.7 ± 1.9 vs 44.7 ± 2.9 , $p = 0.008$ и 55.2 ± 4.8 vs 48.7 ± 1.9 , $p = 0.004$; парный критерий Уилкоксона), но наиболее значимое — на 5-ой неделе гестации (65.7 ± 8.0 vs 55.2 ± 4.8 ; $p = 0.0010$; парный критерий Уилкоксона). Приращение веса на 1 и 2 неде-

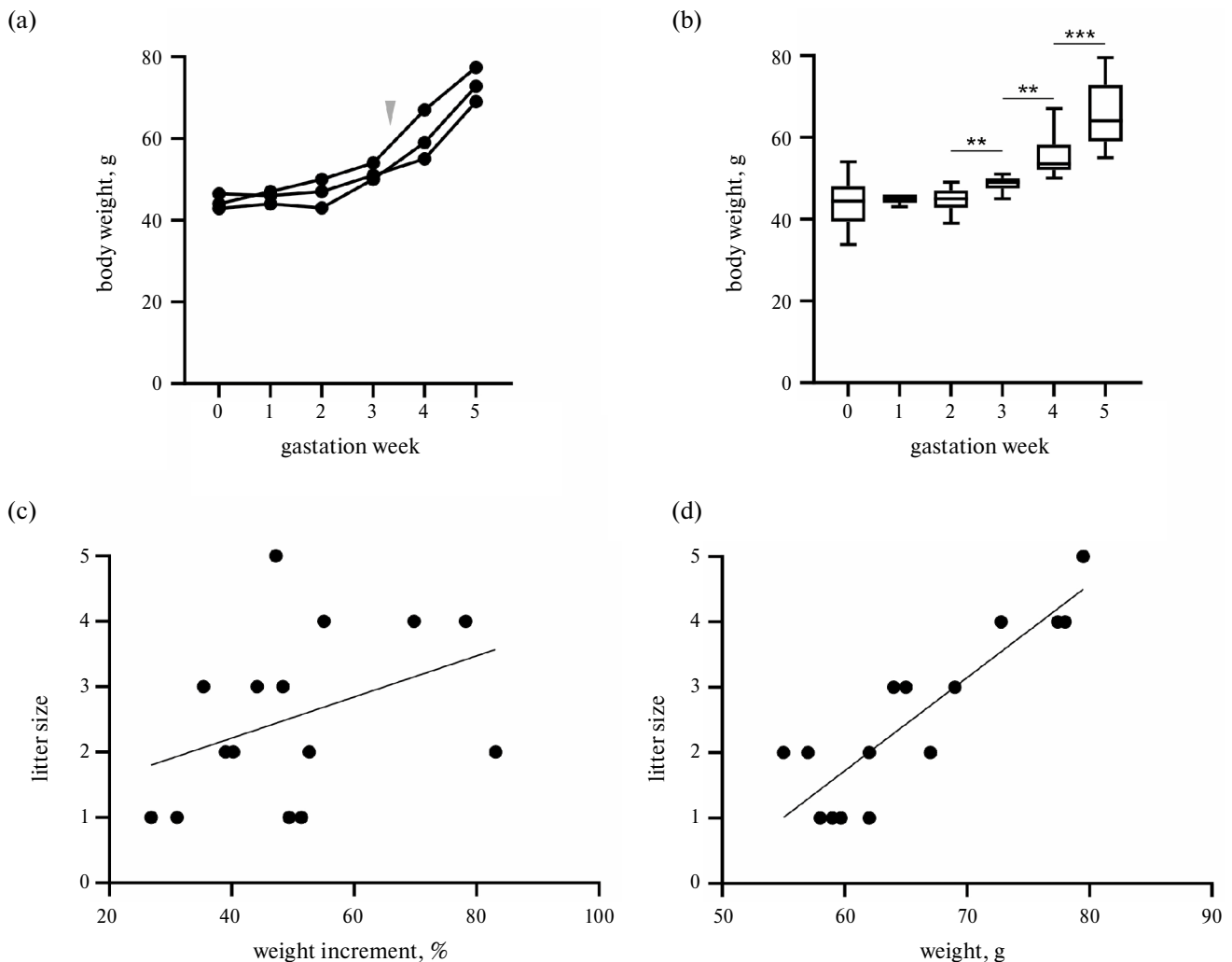


Рис. 4. Набор веса тела самками во время гестации. (а) — Индивидуальные кривые набора веса для трёх самок; серый треугольник маркирует временной промежуток, на котором происходит видимое приращение веса тела. (б) — Средние данные по группе. (с–д) — Взаимосвязь между числом потомков в помёте и набором веса самкой от значений до беременности до значений непосредственно перед родами: (с) — процентный набор веса %, (д) — абсолютный вес, линия на графике — кривая линейной регрессии; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

лях гестации не является достоверным (44.9 ± 1.2 vs 43.9 ± 1.2 , $p = 0.375$; 44.7 ± 2.9 vs 44.9 ± 1.2 , $p = 0.984$; парный критерий Уилкоксона) (рис. 4b). Таким образом, в целом мы подтверждаем наблюдение [26], показавших видимое приращение веса беременной самки каирской иглистой мыши лишь после 30-го дня гестации. В соответствие с этим, скачок веса на пятой неделе гестации — удобный инструмент для детекции момента, когда беременную самку необходимо отсадить от остальных животных и установить за ней более тщательный контроль.

В последнюю неделю гестации самки весили в среднем 65.7 ± 8.0 г, что сходно с литературными данными [26]. Прирост массы тела у беременных самок к моменту родов должен составлять около 50% [26], что мы и наблюдали в нашей колонии ($50.1 \pm 16.2\%$). Из 37 помётов, 6 были одноплодными, 9 — двухплодными, 8 — трёхплодными, 11 — четырёхплодными и 3 — пятиплодными. В литературе указано, что размер помёта иглистой мыши может варьировать от 1 до 5 детёнышей, при этом в большинстве случаев рождается 2 детёныша [20, 26, 41, 62, 76, 77]. В нашей колонии в большинстве случаев рождалось 4 детёныша, таким образом, размер помётов выше, чем в описанных в литературе колониях.

Поскольку разбросы набора веса самками были значительными, и составили 27–83%, мы оценивали зависимость между приростом веса самки (в процентах от массы тела до беременности) и числом детёнышей в помёте. Выявлена достоверная зависимость, как между разностью массы тела до беременности и непосредственно перед родами и числом детёнышей в помёте (коэффициент корреляции Пирсона $r^2 = 0.692$; $p = 0.004$; $n = 15$) (рис. 4c), так и между абсолютным значением массы тела самки перед родами и числом детёнышей в помёте (коэффициент корреляции Пирсона $r^2 = 0.88$; $p < 0.0001$; $n = 15$) (рис. 4d). Отметим одно исключение: при сходном приросте веса: в районе 50%, одна из самок принесла тройню, где каждый детёныш весил 6.0–6.3 г, тогда как другая — единственного детёныша весом около 8.0 г, умершего при родах вследствие неправильного предлежания. Но за этим исключением, вес беременной самки свыше 70 г указывает на наличие 3-х и более детёнышей в помёте.

Иглистые мыши обладают способностью к зачатию в течение нескольких часов после родов (*postpartum*), так же, как и многие другие грызуны: крысы [78], мыши [79], морские свинки [80]. При этом в случае зачатия сразу после родов, у крыс [78] и мышей [79] наблюдается значимое уменьшение количества детёнышей в помёте, а у иглистой мыши [77] — наоборот, увеличение на 9%. Мы сравнили размеры помётов в 2-х группах самок, участвовавших в размножении дважды, но с

разным промежутком между предыдущими родами и зачатием: (1) от 53 до 349 дней ($n = 6$), (2) от 0 до 5 дней (*postpartum*, $n = 6$). В случае повторного зачатия *postpartum*, в помёте было больше детёнышей (3.7 ± 0.8 vs 3.0 ± 1.5), однако эти отличия не являются достоверными ($p = 0.523$; критерий Манна–Уитни). Выявленный нами прирост в числе детёнышей (22%) в целом сходен со значением, полученным ранее в [77].

Для мышей показано, что размер помёта, зачатого вскоре после прекращения лактации, увеличивается, по сравнению с предыдущим помётом [79]. Мы сравнили размер помётов в случаях, когда между предыдущими родами и новым зачатием прошло 19–73 ($n = 4$) дня (что соответствует зачатию во время или вскоре после прекращения лактации) или 278–349 ($n = 3$) дней (то есть на фоне установившегося регулярного полового цикла). В первом случае размер помёта был достоверно больше (4.3 ± 0.5 vs 1.7 ± 0.6 ; $p = 0.028$; критерий Манна–Уитни), но мы просим обратить внимание на малый объём выборки в этом сравнении.

Известно, что у некоторых линий мышей размер помёта зависит от кратности родов: количество детёнышей в помёте возрастает с каждым последующими родами, затем выходит на плато, а затем снижается, тогда как у других линий первый помёт является самым большим [79, 81]. При этом у морских свинок (также малоплодных и зрелорождающихся грызунов) размер помёта от кратности родов не зависит [80]. Поэтому мы также сравнили размер помётов, полученных в результате первых ($n = 19$), вторых ($n = 13$) или третьих ($n = 5$) родов. Достоверных отличий между группами не выявлено (2.5 ± 1.3 vs 3.0 ± 1.5 vs 3.2 ± 0.8 ; $p > 0.999$, критерий Крускала–Уоллиса).

Роды у каирской иглистой мыши, как правило, приходятся на раннее время суток (с пиком в районе 4–6 часов утра) [82], поэтому большинство родов прошли без нашего контроля. В некоторых случаях (4 детёныша из 4-х помётов) мы обнаруживали останки приплода в подстилке; при этом однозначно утверждать о каннибализме мы можем как минимум в 1 случае. Ранее было отмечено, что каннибализм детёнышей — нередкое явление в колонии каирской иглистой мыши [3, 83], однако в нашем случае количество детёнышей, пострадавших от каннибализма, невелико. В литературе указывают на большую агрессивность самок, по сравнению с самцами [72, 73], данные о большей смертности детёнышей в репродуктивных группах с двумя самками, по сравнению с группами, где содержится только одна самка и самец, также представлены [41]. Однако при этом каирских иглистых мышей часто содержат группами, состоящими из 1–2-х самцов и нескольких самок и их потомства [20, 26, 73]. Есть

данные о благополучном совместном проживании двух самок, имеющих близкое родство [77], а также о совместном вскармливании детёнышей несколькими самками, проживающими вместе [73]. Тем не менее, отсаживание беременной самки непосредственно перед родами (приближение родов можно предсказать, основываясь на прибавке веса) помогает решить не только проблему каннибализма, но также контроля над численностью поголовья. Кроме того, формируя репродуктивные группы, мы используем самок, уже ранее содержавшихся вместе.

Потомство. Всего в нашей колонии было получено 37 помётов, включающих 107 детёнышей, из которых от первых родов — 47, от вторых — 44, и от третьих — 16. Среди всех детёнышей, 7 были мёртвоорождёнными или погибли в первые часы после родов, ещё 4 погибли в результате каннибализ-

ма или естественным путём в течение первых суток после рождения (3 из них — групповое содержание, 1 — индивидуальное), 3 детёнышей пострадали от взрослых особей (покусаны хвост, уши, пальцы — все в клетках группового содержания). К сожалению, мы не можем утверждать, что учли все случаи мёртвоорождения и каннибализма, поскольку мёртвые детёныши могли быть полностью съедены самкой или другими взрослыми особями, находящимися в одной клетке (см. [84]: об оценке смертности и каннибализма у мышей), тем не менее, таких случаев не могло быть много, поскольку мы получили высокую корреляцию между весом беременных самок и количеством рожденных детёнышей.

Смертности детёнышей и каннибализма более чем через сутки после родов не наблюдалось. Репродуктивный индекс колонии (отношение числа

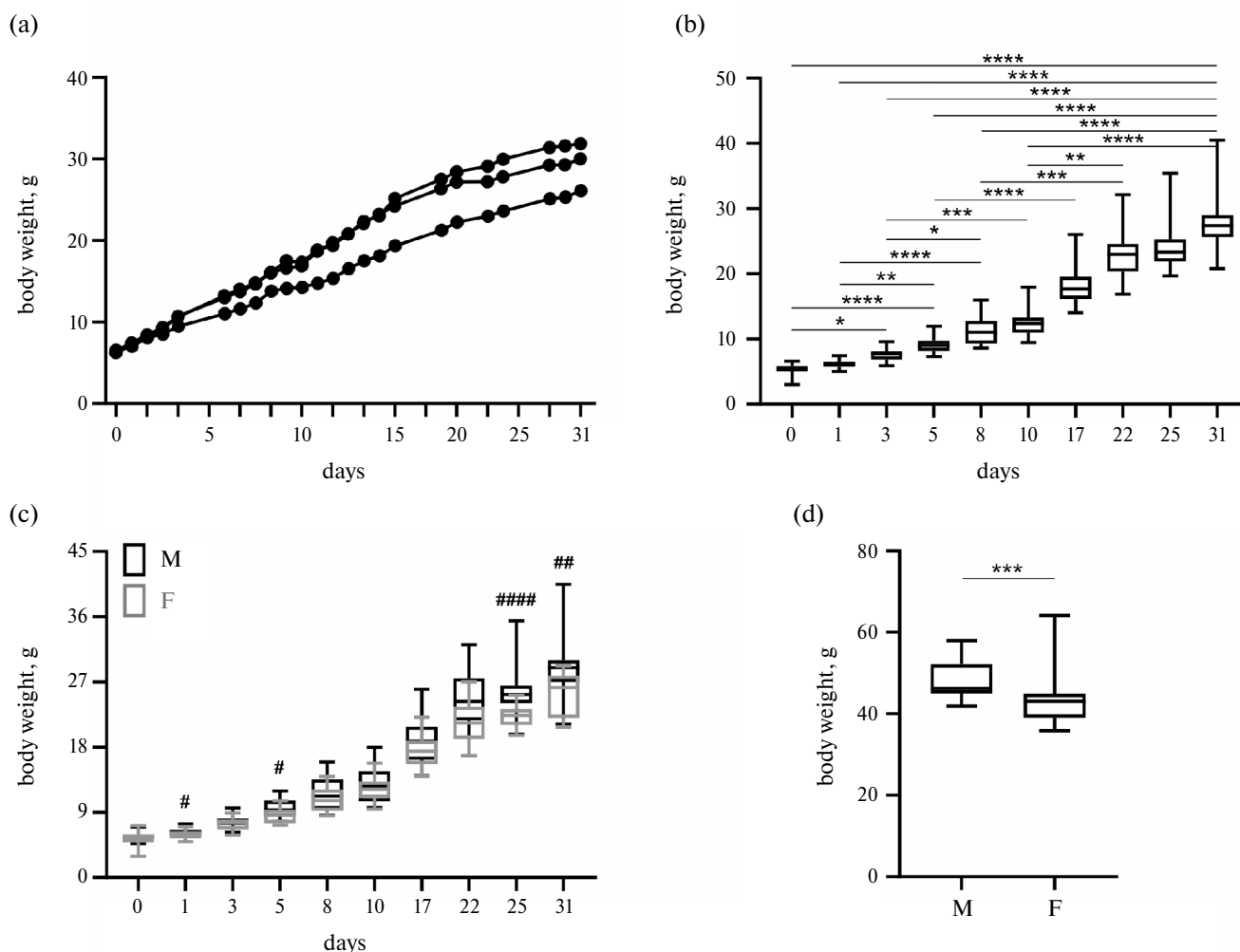


Рис. 5. Набор веса детёнышами после рождения. (a) — Индивидуальные кривые набора веса для трёх детёнышей. (b) — Средние данные по группам детёнышей. (c) — Средние данные по детёнышей мужского (чёрный) и женского (серый) пола. (d) — Средние данные по взрослым самцам (M) и самкам (F). * — отличия между возрастными (тест Крускала–Уоллиса); # — отличия между полами (тест Манна–Уитни); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$.

выживших детёнышей в первые 30 суток к общему числу новорождённых) составил 0.98, что является очень высоким показателем (для сравнения у мышей 0.87–0.93 [85]; у морских свинок выживаемость составляет 70–80% [80, 86]). Для разных колоний каирской иглистой мыши показано, что смертность единичных детёнышей из помёта не высока (1.3–2.1%), но в случаях, когда кормящие самки отказываются от заботы о потомстве, происходит гибель всего помёта [41]. В нашей колонии последнего не наблюдалось. Возможно, это связано с содержанием животных в обогащённой среде, что снижает тревожность кормящих самок, и, как следствие, улучшает выживаемость детёнышей, подобно тому, как это показано для мышей [85], своевременным отсаживанием беременных самок в отдельные клетки, увеличением количества корма (в частности, смеси сушеных членистоногих) для беременных и кормящих самок.

На момент рождения средний вес детёнышей составлял 5.7 ± 0.5 г у самцов и 5.4 ± 0.8 г самок; зависимости от пола не выявлено ($p = 0.136$, $n = 26$, $n = 28$; критерий Манна–Уитни). Динамику приращения массы тела от рождения до возраста 31 день оценивали на выборке из 58 детёныша. Уменьшение объёма выборки связано с тем, что помёты, детёныши из которых были взяты на острые опыты в разном возрасте, исключили из анализа (при изъятии части детёнышей из помёта на оставшихся детёнышей приходится больше молока, соответственно, прирост веса резко изменится [87]).

Почти у всех каирских иглистых мышей, вне зависимости от пола, от рождения до возраста 3–4 недель происходило почти линейное приращение веса, немного затухающее на 4-ой постнатальной неделе (см. индивидуальные кривые на рис. 5a). Достоверность отличий этого приращения по группе показана на рисунке 5b. Отличия между самцами и самками по массе тела выявлены для 4-х временных точек из десяти проанализированных: 1-го, 5-го, 25-го и 31-го постнатальных дней (рис. 5c). Отметим, что отличия по весу тела между взрослыми самцами и самками также достоверны (48.5 ± 5.1 vs 43.3 ± 5.4 ; $p < 0.001$; тест Манна–Уитни) (рис. 5d). В литературе имеются данные веса каирской иглистой мыши для трёх возрастов [1, 14, 88]; в целом, наши данные сходны с ними, что указывает на общую динамику набора веса в разных колониях.

Как можно видеть на рис. 5, данные веса детёнышей имеют большие разбросы, что, скорее всего, связано с размером помёта: в нашей выборке 2 детёнышей были из 1-плодного помёта, 9 — из 2-плодных помётов, 15 — из 3-плодных помётов, 23 — из 4-плодных помётов, 5 — из 5-плодного помёта. Поэтому мы вычислили коэффициент корреляции Пирсона между значениями веса тела жи-

вотного на разных возрастах и числом потомков в помёте. Корреляцию считали отдельно для самцов и самок. Данные представлены в таблице 2. В таблице 3 представлены данные о среднем весе самцов и самок в возрасте от рождения до 31 дней, рождённых в помётах разного размера.

Таким образом, для большинства возрастов (и для обоих полов), корреляция между анализируемыми параметрами является негативной и достоверной на высоком уровне значимости; достоверная корреляция также показана для взрослых самцов. Подобная зависимость веса новорождённых от размера помёта [86, 89, 90] и пола [86, 90] показана и для морских свинок. Считается, что скорость набора веса у детёнышей каирской иглистой мыши зависит не только от веса при рождении, но и от молочности самки [14]. Влияние размера помёта на вес детёнышей сохраняется достаточно длительно, в течение как минимум месяца, т.е. даже в период, когда детёныши в состоянии питаться твердой пищей, и не зависят исключительно от питания материнским молоком, подобно тому, как отмечено в [14].

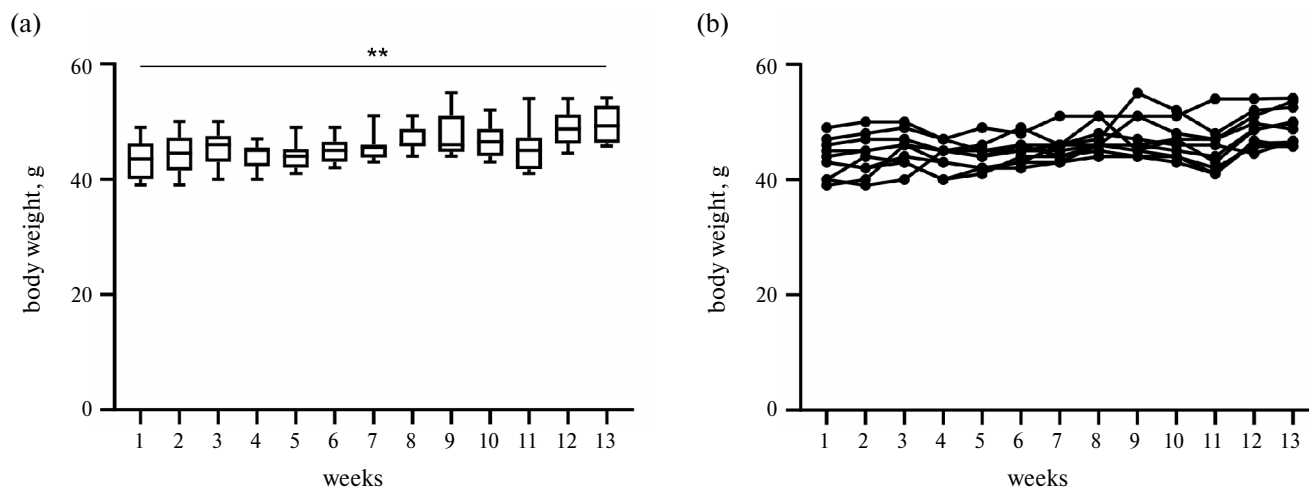
Согласно данным литературы, в период между 1-м и 2-м месяцами происходит изменение шерстного покрова каирской иглистой мыши: появление “взрослой” игольчатой шерсти [19]; у наших

Таблица 2. Зависимость между весом тела детёнышей разного возраста и размером помёта (коэффициент корреляции Пирсона, r). 0–31 — постнатальный день; ВЗР — взрослые особи. ns — non-significant.

Возраст, дни	Самцы	Самки
0	-0.65 ; $n = 26$ $p = 0.0003$ ***	-0.09 ; $n = 28$ $p = 0.619$ ns
1	-0.78 ; $n = 18$ $p = 0.0001$ ***	-0.35 ; $n = 29$ $p = 0.065$ ns
3	-0.82 ; $n = 21$ $p < 0.0001$ ****	-0.42 ; $n = 31$ $p = 0.017$ *
5	-0.82 ; $n = 18$ $p < 0.0001$ ****	-0.54 ; $n = 20$ $p = 0.014$ *
8	-0.88 ; $n = 16$ $p < 0.0001$ ****	-0.79 ; $n = 17$ $p = 0.0001$ ***
10	-0.81 ; $n = 18$ $p < 0.0001$ ****	-0.64 ; $n = 25$ $p = 0.0006$ ***
17	-0.81 ; $n = 18$ $p < 0.0001$ ****	-0.70 ; $n = 29$ $p < 0.0001$ ****
22	-0.95 ; $n = 11$ $p < 0.0001$ ****	-0.86 ; $n = 17$ $p < 0.0001$ ****
31	-0.83 ; $n = 15$ $p = 0.0001$ ***	-0.89 ; $n = 14$ $p < 0.0001$ ****
ВЗР	-0.52 ; $n = 19$ $p = 0.023$ *	-0.29 ; $n = 32$ $p = 0.112$ ns

Таблица 3. Средняя масса тела самцов и самок в возрасте от рождения до 31 дня, рождённых в помётах разного размера. 1–5 — размер помёта; 0–31 — постнатальный день.

Возраст, дни	Самцы					Самки				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0	6.6	6.4 ± 0.5	5.8 ± 0.3	5.5 ± 0.4	5.3	3	6.0 ± 0.7	5.7 ± 0.6	5.4 ± 0.6	5.1 ± 0.2
1	7.2	6.6 ± 0.3	6.5 ± 0.4	6.1 ± 0.3	5.8	6.2 ± 0.2	6.0 ± 0.6	6.4 ± 0.5	5.8 ± 0.6	5.5 ± 0.2
3	9.6	8.3 ± 0.1	8.0 ± 0.7	7.3 ± 0.6	6.9	7.9 ± 0.9	8.0 ± 0.4	8.1 ± 0.8	7.0 ± 1.0	7.1 ± 0.3
5	12	10.7 ± 0.1	9.5 ± 1.2	8.8 ± 0.7	8.1	10.7	10.1 ± 0.1	8.6 ± 1.0	8.4 ± 1.1	8.50 ± 0.2
8	14	13.3 ± 0.4	11.3 ± 1.9	8.9 ± 0.4	9.1	14	13.2 ± 0.3	11.1 ± 1.2	8.6 ± 0.02	9.5 ± 0.3
10	18	14.9 ± 0.3	12.6 ± 2.2	11.5 ± 1.5	10.3	14.4 ± 2.0	13.5 ± 1.8	12.2 ± 1.2	11.7 ± 1.6	10.7 ± 0.5
17	26	21.6 ± 1.1	18.6 ± 2.6	17.7 ± 1.8	14.1	20.4 ± 1.6	18.4 ± 1.8	17.7 ± 1.4	17.2 ± 1.5	14.8 ± 0.5
22	32.2	26.2 ± 1.3	24.6 ± 3.2	21.1 ± 1.1	16.9	27.1	22.9 ± 1.8	22.9 ± 1.3	20.8 ± 0.5	17.8 ± 0.6
31	40.5	30.4 ± 1.4	28.9 ± 2.7	27.8 ± 1.0	21.2	29.3	28.0 ± 0.2	26.3 ± 1.3	27.4	21.7 ± 0.6

**Рис. 6.** Динамика веса самцов во время 13-недельного мониторинга. (а) — Средние данные по группе. (б) — Индивидуальные значения для всех животных. ** $p < 0.01$.

животных появление такой шерсти было отмечено в возрасте 1 месяца. Отметим, что несмотря на информацию о достижении каирской иглистой мышью половой зрелости в возрасте 2-х месяцев [19], наши собственные данные указывают на то, что самцы приобретают фертильность ранее: в районе 1.0–1.5 месяцев, что совпадает с появлением первых иголок в шерсти. Поэтому отсаживание потомства мужского пола следует проводить не позднее 30 дня жизни детёнышей, во избежание их спаривания с матерью.

Самцы. Поскольку до 50% популяции лабораторных каирских иглистых мышей склонны к ожирению [55], мы непрерывно измеряли массу тела 10 самцов на протяжении 13 недель. На момент начала мониторинга возраст самцов составил 3 месяца.

Выявлено приращение веса тела между 1-ой и 13-ой неделями (43.6 ± 3.3 vs 49.4 ± 3.2 ; $p = 0.0020$; тест Манна–Уитни) (рис. 6), соответствующее естественному возрастному приросту массы у самцов в период с 3 по 6 месяц [55], т.е. у данной группы признаки ожирения отсутствуют.

Таким образом, в нашей лаборатории успешно развивается колония каирской иглистой мыши. Основные параметры колонии соответствуют общемировым стандартам. Ряд разработанных нами процедур, включая ежедневный хендлинг, доступ к беговому колесу, добавление высокобелкового прикорма в виде сушёных членистоногих, позволили снизить тревожность и агрессивное поведение каирской иглистой мыши, увеличить среднюю плодовитость самок и достичь почти 100% выживаемости

приплода. Полагаем, данные методические наработки будут полезны другим исследовательским группам, использующим это лабораторное животное.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Планирование эксперимента: Н.С.М., П.Ю.Ш., А.А.В.; сбор и обработка данных: П.Ю.Ш., А.А.В., А.А.М., Н.И.Н., А.В.Б.; написание и редактирование манускрипта: Н.С.М., П.Ю.Ш., А.А.В., А.А.М.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные процедуры проводились в соответствии с требованиями Директивы Совета Европы 2010 / 63EU Европейского парламента о защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Протокол исследования (№ 02/17 от 17 февраля 2022 г) был одобрен Этическим комитетом Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа была проведена в рамках государственной программы 47 ГП «Научное и технологическое развитие Российской Федерации (2019–2030), тема 0134-2019-0006. Работа также поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№1021062411653-4-3.1.8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brunjes PC (1990) The precocial mouse, *Acomys cahirinus*. *Psychobiology* 18:339–350. <https://doi.org/10.3758/BF03327252>
2. Jeremy P, Bates J (1994) The distribution of *Acomys* (*Rodentia: Muridae*) in Africa and Asia. *Isr J Zool* 40:199–214. <https://doi.org/10.1080/00212210.1994.10688748>
3. Pinheiro G, Prata DF, Araújo IM, Tiscornia G (2018) The African spiny mouse (*Acomys spp.*) as an emerging model for development and regeneration. *Lab Anim* 52:565–576. <https://doi.org/10.1177/0023677218769921>
4. Carleton MD, Musser GG (1984) Muroid rodents. In: Anderson S, Jones JK (eds) *Orders and families of recent mammals of the world*. Wiley, New York, pp. 289–379
5. Denys C (1990) The oldest *Acomys* (*Rodentia, Muridae*) from the lower Pliocene of South Africa and the problem of its murid affinities. *Paleontogr Abt A* 210:79–91
6. Barome P-O, Volobuev V, Monnerot M, Mfune JK, Chitaukali W, Gautun J-C, Denys C (2001) Phylogeny of *Acomys spinosissimus* (*Rodentia, Muridae*) from north Malawi and Tanzania: evidence from morphological and molecular analysis. *Biol J Linn Soc* 73:321–340. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2001.tb01366.x>
7. Denys C, Michaux J, Peter F, Aguilar JP, Jaeger JJ (1992) Molar morphology as a clue to the phylogenetic relationship of *Acomys* to the murinae. *Isr J Zool* 38:253–262. <https://doi.org/10.1080/00212210.1992.10688673>
8. Chevret P, Denys C, Jaeger JJ, Michaux J, Catzeflis FM (1993) Molecular evidence that the spiny mouse (*Acomys*) is more closely related to gerbils (*Gerbillinae*) than to true mice (*Murinae*). *Proc Natl Acad Sci* 90:3433–3436. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3433>
9. Hänni C, Laudet V, Barriel V, Catzeflis FM (1995) Evolutionary relationships of *Acomys* and other murids (*Rodentia, mammalia*) based on complete 12s rRNA mitochondrial gene sequences. *Isr J Zool* 41:131–146. <https://doi.org/10.1080/00212210.1995.10688785>
10. Gustavsen CR, Kvicerova J, Dickinson H, Heller RS (2009) *Acomys*, the closest relatives to Gerbils, do express Pdx-1 protein and have similar islet morphology to Gerbils. *Islets* 1:191–197. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9557>
11. Morrison P, Dieterich R, Preston D (1977) Longevity and mortality in 15 rodent species and subspecies maintained in laboratory colonies. *Acta Theriol (Warsz)* 22:317–335. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.77-29>
12. Brunjes PC (1984) Hippocampal maturation in the precocial murid rodent *Acomys cahirinus*. *Brain Behav Evol* 24:58–64. <https://doi.org/10.1159/000121305>
13. Brunjes PC (1985) A stereological study of neocortical maturation in the precocial mouse, *Acomys cahirinus*. *Dev Brain Res* 19:279–287. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(85\)90199-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(85)90199-3)
14. Porter RH, Makin JW, Matochik JA (1986) Physical and behavioral sequelae of low birthweight in spiny mice (*Acomys cahirinus*). *Dev Psychobiol* 19:463–472. <https://doi.org/10.1002/dev.420190507>
15. Kronfeld-Schor N, Dayan T (1999) The dietary basis for temporal partitioning: food habits of coexisting *Acomys* species. *Oecologia* 121:123–128. <https://doi.org/10.1007/s004420050913>
16. Kronfeld-Schor N, Dayan T, Jones ME, Kremer I, Mandelik Y, Wollberg M, Yassur Y, Gatton DD (2001) Retinal structure and foraging microhabitat use of the golden spiny mouse (*Acomys russatus*). *J Mammal* 82:1016–1025. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2001\)082<1016:R-SAFMU>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2001)082<1016:R-SAFMU>2.0.CO;2)
17. Cohen R, Kronfeld-Schor N, Ramanathan C, Baumgras A, Smale L (2010) The substructure of the suprachiasmatic nucleus: Similarities between nocturnal and diurnal spiny mice. *Brain Behav Evol* 75:9–22. <https://doi.org/10.1159/000282172>
18. Hoole C, Oosthuizen MK, Chimimba CT, Bennett NC (2012) The locomotory activity rhythm of the spiny mouse, *Acomys spinosissimus* from southern Africa: light entrainment and endogenous circadian rhythms. *J Zool* 288:93–102. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2012.00928.x>
19. Montandon SA, Tzika AC, Martins AF, Chopard B, Milinkovitch MC (2014) Two waves of anisotropic growth generate enlarged follicles in the spiny mouse. *Evodevo* 5:33. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-33>

20. Haughton CL, Gawriluk TR, Seifert AW (2016) The biology and husbandry of the african spiny mouse (*Acomys cahirinus*) and the research uses of a laboratory colony. J Am Assoc Lab Anim Sci 55:9–17.
21. Denys C, Gautun JC, Tranier M, Volobouev V (1994) Evolution of the genus *Acomys* (Rodentia, Muridae) from dental and chromosomal patterns. Isr J Zool 40:215–246. <https://doi.org/10.1080/00212210.1994.10688749>
22. Volobouev V, Auffray JC, Debat V, Denys C, Gautun JC, Tranier M (2007) Species delimitation in the *Acomys cahirinus-dimidiatus* complex (Rodentia, Muridae) inferred from chromosomal and morphological analyses. Biol J Linn Soc 91:203–214. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00773.x>
23. Aghová T, Palupčíková K, Šumbera R, Frynta D, Lavrenchenko LA, Meheretu Y, Sádlová J, Votýpka J, Mbau JS, Modrý D, Bryja J (2019) Multiple radiations of spiny mice (Rodentia: *Acomys*) in dry open habitats of Afro-Arabia: evidence from a multi-locus phylogeny. BMC Evol Biol 19:69. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1380-9>
24. Shkolnik A, Borut A (1969) Temperature and water relations in two species of spiny mice (*Acomys*). J Mammal 50:245–255. <https://doi.org/10.2307/1378340>
25. Dawirs RR, Teuchert-Noodt G, Kacza J (1992) Naturally occurring degrading events in axon terminals of the dentate gyrus and stratum lucidum in the spiny mouse (*Acomys cahirinus*) during maturation, adulthood and aging. Dev Neurosci 14:210–220. <https://doi.org/10.1159/000111665>
26. Dickinson H, Walker DW (2007) Managing a colony of spiny mice (*Acomys cahirinus*) for perinatal research. Aust New Zeal Counc Care Anim Res Train News 20:4–11.
27. Wong W, Kim A, Monaghan JR, Seifert AW, Maden M, Crane JD (2020) Spiny mice (*Acomys*) exhibit attenuated hallmarks of aging and rapid cell turnover after UV exposure in the skin epidermis. PLoS One 15: e0241617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241617>
28. Weigl R (2005) Longevity of mammals in captivity; from the living collections of the world: a list of mammalian longevity in captivity. Kleine Senckenberg-r 214.
29. Cohen R, Smale L, Kronfeld-Schor N (2009) Plasticity of circadian activity and body temperature rhythms in golden spiny mice. Chronobiol Int 26:430–446. <https://doi.org/10.1080/07420520902820939>
30. Shargal E, Rath-Wolfson L, Kronfeld N, Dayan T (1999) Ecological and histological aspects of tail loss in spiny mice (Rodentia: Muridae, *Acomys*) with a review of its occurrence in rodents. J Zool 249:187–193. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1999.tb00757.x>
31. Brant JO, Yoon JH, Polvadore T, Barbazuk WB, Maden M (2016) Cellular events during scar-free skin regeneration in the spiny mouse, *Acomys*. Wound Repair Regen 24:75–88. <https://doi.org/10.1111/wrr.12385>
32. Maden M (2018) Optimal skin regeneration after full thickness thermal burn injury in the spiny mouse, *Acomys cahirinus*. Burns 44:1509–1520. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.05.018>
33. Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR, Palmer TM, Maden M (2012) Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). Nature 489:561–565. <https://doi.org/10.1038/nature11499>
34. Okamura DM, Brewer CM, Wakenight P, Bahrami N, Bernardi K, Tran A, Olson J, Shi X, Yeh S-Y, Piliponsky A, Collins SJ, Nguyen ED, Timms AE, MacDonald JW, Bammler TK, Nelson BR, Millen KJ, Beier DR, Majesky MW (2021) Spiny mice activate unique transcriptional programs after severe kidney injury regenerating organ function without fibrosis. iScience 24:103269. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103269>
35. Maden M, Brant JO, Rubiano A, Sandoval AGW, Simmons C, Mitchell R, Collin-Hooper H, Jacobson J, Omaili S, Patel K (2018) Perfect chronic skeletal muscle regeneration in adult spiny mice, *Acomys cahirinus*. Sci Rep 8:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27178-7>
36. Peng H, Shindo K, Donahue RR, Gao E, Ahern BM, Levitan BM, Tripathi H, Powell D, Noor A, Elmore GA, Satin J, Seifert AW, Abdel-Latif A (2021) Adult spiny mice (*Acomys*) exhibit endogenous cardiac recovery in response to myocardial infarction. npj Regen Med 6:74. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00186-4>
37. Streeter KA, Sunshine MD, Brant JO, Sandoval AGW, Maden M, Fuller DD (2020) Molecular and histologic outcomes following spinal cord injury in spiny mice, *Acomys cahirinus*. J Comp Neurol 528:1535–1547. <https://doi.org/10.1002/cne.24836>
38. Nogueira-Rodrigues J, Leite SC, Pinto-Costa R, Sousa SC, Luz LL, Sintra MA, Oliveira R, Monteiro AC, Pinheiro GG, Vitorino M, Silva JA, Simão S, Fernandes VE, Provazník J, Benes V, Cruz CD, Safronov B V, Magalhães A, Reis CA, Vieira J, Vieira CP, Tiscórnica G, Araújo IM, Sousa MM (2022) Rewired glycosylation activity promotes scarless regeneration and functional recovery in spiny mice after complete spinal cord transection. Dev Cell 57:440–450.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.12.008>
39. Maden M, Varholick JA (2020) Model systems for regeneration: the spiny mouse, *Acomys cahirinus*. Development 147: dev167718. <https://doi.org/10.1242/dev.167718>
40. Gaire J, Varholick JA, Rana S, Sunshine MD, Doré S, Barbazuk WB, Fuller DD, Maden M, Simmons CS (2021) Spiny mouse (*Acomys*): an emerging research organism for regenerative medicine with applications beyond the skin. npj Regen Med 6:1. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00111-1>
41. Young DAB (1976) Breeding and fertility of the egyptian spiny mouse, *Acomys cahirinus*: effect of different environments. Lab Anim 10:15–24. <https://doi.org/10.1258/002367776780948961>
42. Lambert LJ, Muzumdar MD, Rideout WM, Jacks T (2017) Basic mouse methods for clinician researchers. In: Basic Science Methods for Clinical Researchers. Elsevier, pp. 291–312
43. Parra-Vargas M, Bouret SG, Bruning JC, de Moura EG, Garland T, Lisboa PC, Ozanne SE, Patti M-E, Plagemann A, Speakman JR, Tena-Sempere M, Vergely C, Zeltser LM, Jiménez-Chillaron JC (2023) The long-lasting shadow of litter size in rodents: litter size is an underreported varia-

- ble that strongly determines adult physiology. *Mol Metab* 71:101707.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101707>
44. Stevens S, Mohan S (2021) Opioid withdrawal behavior in spiny mice: A novel preclinical model of neonatal opioid withdrawal syndrome (NOWS). *Heliyon* 7: e06694.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06694>
 45. Lamers WH, Mooren PG, Charles R (1985) Perinatal development of the small intestine and pancreas in rat and spiny mouse. *Biol Neonate* 47:153–162.
<https://doi.org/10.1159/000242107>
 46. Lamers WH, Mooren PG, De Graaf A, Charles R (1985) Perinatal development of the liver in rat and spiny mouse. *Eur J Biochem* 146:475–480.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08675.x>
 47. Dickinson H, Walker DW, Cullen-McEwen L, Wintour EM, Moritz K (2005) The spiny mouse (*Acomys cahirinus*) completes nephrogenesis before birth. *Am J Physiol Physiol* 289: F273–F279.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00400.2004>
 48. Tessitore C, Brunjes PC (1988) A comparative study of myelination in precocial and altricial murid rodents. *Dev Brain Res* 43:139–147.
[https://doi.org/10.1016/0165-3806\(88\)90159-9](https://doi.org/10.1016/0165-3806(88)90159-9)
 49. Дмитриева ДЯ, Даниленкова ЛВ, Гоццо С (1987) Сравнительное исследование мозга у зрело- и незрелорождающихся грызунов из семейства мышиных. Журнал эволюционной биохимии и физиологии 23:127–131. [Dmitrieva DY, Danilenkova LV, Gocco S (1987) Comparative study of the brain in mature and immature rodents from the mouse family. Zhurnal evolyucionnoj biohimii i fiziologii 23:127–131. (In Russ)]
 50. Даниленкова ЛВ (1992) Морфометрическое исследование постнатального синаптогенеза в неокортексе зрело- и незрелорождающихся грызунов. Журнал эволюционной биохимии и физиологии 28:140–142. [Danilenkova LB (1992) Morphometric study of postnatal synaptogenesis in the neocortex of mature- and immature-borning rodents. Zhurnal evolyucionnoj biohimii i fiziologii 28:140–142. (In Russ)].
 51. Gozzo S, Dimitrieva N, Iacopino C, D'udine B (1985) A comparative study of mossy fiber distribution in the brain of the precocial *Acomys cahirinus* and of the altricial *Rattus norvegicus*: Neuroanatomical bases and behavioral correlates. *Int J Neurosci* 28:163–172.
<https://doi.org/10.3109/00207458508985387>
 52. Bellofiore N, Ellery SJ, Mamrot J, Walker DW, Temple-Smith P, Dickinson H (2017) First evidence of a menstruating rodent: the spiny mouse (*Acomys cahirinus*). *Am J Obstet Gynecol* 216:40.e1–40.e11.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.07.041>
 53. Bellofiore N, Evans J (2019) Monkeys, mice and menses: the bloody anomaly of the spiny mouse. *J Assist Reprod Genet* 36:811–817.
<https://doi.org/10.1007/s10815-018-1390-3>
 54. Bellofiore N, George E, Vollenhoven B, Temple-Smith P (2021) Reproductive aging and menopause-like transition in the menstruating spiny mouse (*Acomys cahirinus*). *Hum Reprod* 36:3083–3094.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deab215>
 55. Gonet AE, Stauffacher W, Pictet R, Renold AE (1966) Obesity and diabetes mellitus with striking congenital hyperplasia of the islets of langerhans in spiny mice (*Acomys cahirinus*). *Diabetologia* 1:162–171.
<https://doi.org/10.1007/BF01257907>
 56. Pictet R, Orci L, Gonet AE, Rouiller C, Renold AE (1967) Ultrastructural studies of the hyperplastic islets of Langerhans of spiny mice (*Acomys cahirinus*) before and during the development of hyperglycemia. *Diabetologia* 3:188–211.
<https://doi.org/10.1007/BF01222197>
 57. Trueheart PA, Maldonado A, Kaelin D, Renold AE, Sharp GWG (1976) Proinsulin synthesis in islets of Langerhans from spiny mice (*Acomys cahirinus*). comparison with rats and mice. *Diabetologia* 12:463–470.
<https://doi.org/10.1007/BF01219510>
 58. Shafir E (2000) Overnutrition in spiny mice (*Acomys cahirinus*): β -cell expansion leading to rupture and overt diabetes on fat-rich diet and protective energy-wasting elevation in thyroid hormone on sucrose-rich diet. *Diabetes Metab Res Rev* 16:94–105.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-7560\(200003/04\)16:2<94::AID-DMRR82>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-7560(200003/04)16:2<94::AID-DMRR82>3.0.CO;2-U)
 59. Kumar S, Singh R, Vasudeva N, Sharma S (2012) Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. *Cardiovasc Diabetol* 11:9.
<https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-9>
 60. Shafir E, Ziv E, Kalman R (2006) Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *Acomys cahirinus* (spiny mice) and *Psammomys obesus* (desert gerbil). *ILAR J* 47:212–224.
<https://doi.org/10.1093/ilar.47.3.212>
 61. Colby LA, Rush HG, Mahoney MM, Lee TM (2012) Degu. In: The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents. Elsevier, pp 1031–1053
 62. Canova L, Fasola M (1994) Population density and diet of the Spiny Mouse *Acomys cf. cahirinus* (Rodentia) in a desert area of northern Kenya. *Rev d'Écologie (La Terre La Vie)* 49:87–90.
<https://doi.org/10.3406/rev.1994.2129>
 63. Chen M, Kan L, Ledford BT, He J-Q (2016) Tattooing various combinations of ears, tail, and toes to identify mice reliably and permanently. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55:189–198.
 64. Matias Santos D, Rita AM, Casanellas I, Brito Ova A, Araújo IM, Power D, Tiscornia G (2016) Ear wound regeneration in the African spiny mouse *Acomys cahirinus*. *Regeneration* 3:52–61.
<https://doi.org/10.1002/reg.2.50>
 65. Carere C, Casetti R, de Acetis L, Perretta G, Cirulli F, Alleva E (1999) Behavioural and nociceptive response in male and female spiny mice (*Acomys cahirinus*) upon exposure to snake odour. *Behav Processes* 47:1–10.
[https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(99\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(99)00048-0)
 66. Gouveia K, Hurst JL (2013) Reducing mouse anxiety during handling: effect of experience with handling tunnels. *PLoS One* 8: e66401.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066401>
 67. Bogdanske JJ, Van Stelle SH, Riley MR, Schiffman BM (2010) Laboratory mouse and laboratory rat procedural techniques, 1st ed. CRC Press

68. The university of Queensland Animal Ethics Committee, Handling and restraint in rats and neonates (LAB_039). https://www.uq.edu.au/research/files/52592/LAB_039
69. Queen's University Care Committee Standard Operating Procedure, Manual Restraint of Rats (Document 10.20). <https://www.queensu.ca/animals-in-science/policies-procedures/sop/rats/10-20>
70. Gonzalez Abreu JA, Rosenberg AE, Fricker BA, Wallace KJ, Seifert AW, Kelly AM (2022) Species-typical group size differentially influences social reward neural circuitry during nonreproductive social interactions. *iScience* 25:104230. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104230>
71. Fricker BA, Seifert AW, Kelly AM (2022) Characterization of social behavior in the spiny mouse, *Acomys cahirinus*. *Ethology* 128:26–40. <https://doi.org/10.1111/eth.13234>
72. Porter RH (1976) Sex-differences in the agonistic behavior of spiny-mice (*Acomys cahirinus*). *Z Tierpsychol* 40:100–108. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1976.tb00928.x>
73. Porter RH, Doane HM (1978) Studies of maternal behavior in spiny mice (*Acomys cahirinus*). *Z Tierpsychol* 47:225–235. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1978.tb01833.x>
74. Varholick JA, Godinez G, Mobin S, Jenkins A, Romeo RD, Corll J, Barbazuk WB, Maden M (2022) Social dominance status and social stability in spiny mice (*Acomys cahirinus*) and its relation to ear-hole regeneration and glucocorticoids. *bioRxiv* 2022.09.13.507818. <https://doi.org/10.1101/2022.09.13.507818>
75. Varholick JA, Godinez G, Jenkins A, Mobin S, Maden M (2024) Bite wounds and dominance structures in male and female African spiny mice (*Acomys cahirinus*): implications for animal welfare and the generalizability of experimental results. *Animals* 14:64. <https://doi.org/10.3390/ani14010064>
76. Degen AA, Khokhlova IS, Kam M, Snider I (2002) Energy requirements during reproduction in female common spiny mice (*Acomys cahirinus*). *J Mammal* 83:645–651. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2002\)083<0645:ER-DRIF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2002)083<0645:ER-DRIF>2.0.CO;2)
77. Frynta D, Fraňková M, Čížková B, Skarlandtová H, Galeštoková K, Průšová K, Šmilauer P, Šumbera R (2011) Social and life history correlates of litter size in captive colonies of precocial spiny mice (*Acomys*). *Acta Theriol (Warsz)* 56:289–295. <https://doi.org/10.1007/s13364-011-0024-2>
78. Bacon SJ, McClintock MK (1999) Sex ratio bias in postpartum-conceived Norway rat litters is produced by embryonic loss in midpregnancy. *Reproduction* 117:403–411. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170403>
79. Krackow S, Gruber F (1990) Sex ratio and litter size in relation to parity and mode of conception in three inbred strains of mice. *Lab Anim* 24:345–352. <https://doi.org/10.1258/002367790780865895>
80. Genzer SC, Flietstra T, Coleman-McCray JD, Tansey C, Welch SR, Spengler JR (2023) Effect of parental age, parity, and pairing approach on reproduction in strain 13/N guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Animals* 13:895. <https://doi.org/10.3390/ani13050895>
81. Biggers JD, Finn CA, McLaren A (1962) Long-term reproductive performance of female mice. *Reproduction* 3:313–330. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0030313>
82. Dieterlen F (1962) Geburt und Geburtshilfe bei der Stachelmaus, *Acomys cahirinus*. *Z Tierpsychol* 19:191–222. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1962.tb00769.x>
83. Dickinson H, Griffiths T, Walker DW, Jenkin G (2008) Application of clinical indices of fetal growth and wellbeing to a novel laboratory species, the spiny mouse. *Reprod Biol* 8:229–243. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60014-X](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60014-X)
84. Brajon S, Morello GM, Capas-Peneda S, Hultgren J, Gilbert C, Olsson A (2021) All the pups we cannot see: cannibalism masks perinatal death in laboratory mouse breeding but infanticide is rare. *Animals* 11:2327. <https://doi.org/10.3390/ani11082327>
85. Whitaker JW, Moy SS, Pritchett-Corning KR, Fletcher CA (2016) Effects of enrichment and litter parity on reproductive performance and behavior in BALB/c and 129/Sv Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55:387–399.
86. Czarnecki R, Adamski M (2016) Factors influencing litter size and birthweight in the newborn long-haired guinea pigs (*Cavia aperea f. porcellus*). *J Appl Anim Res* 44:71–76. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1013961>
87. Argente-Arízón P, Ros P, Díaz F, Fuente-Martin E, Castro-González D, Sánchez-Garrido MÁ, Barrios V, Tena-Sempere M, Argente J, Chowen JA (2016) Age and sex dependent effects of early overnutrition on metabolic parameters and the role of neonatal androgens. *Biol Sex Differ* 7:26. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0079-5>
88. Michalek H, Pintor A, Fortuna S, Bisso GM (1984) Brain acetylcholinesterase and its molecular forms in a precocial murid, *Acomys cahirinus*, and rat during post-natal development. *Acta Biochim Pol* 31:149–160.
89. Stern JJ (1971) Litter size and weight gain of neonatal guinea pigs. *Psychol Rep* 28:981–982. <https://doi.org/10.2466/pr0.1971.28.3.981>
90. Guerrero Pincay AE, González Marcillo RL, Castro Guamán WE, Ortiz Naveda NR, Grefa Reascos DA, Guamán Rivera SA (2020) Influence of litter size at birth on productive parameters in guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Animals* 10:2059. <https://doi.org/10.3390/ani10112059>

DEVELOPMENT OF *ACOMYS CAHIRINUS* IN THE LABORATORY CONDITIONS

**P. Y. Shkorbatova, A. A. Veshchitskii, A. A. Mikhalkin, N. I. Nikitina,
A. V. Belyaev and N. S. Merkulyeva[#]**

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

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

The Cairo spiny mouse (*Acomys cahirinus*) is a unique animal model for studying ontogenesis and regeneration. At the same time, the features of its biology, in particular, the small number of pups in the litter, significantly complicate research work. The aim of the article was to study the behavior and reproduction of the Cairo spiny mice and to create the reproductive nucleus of the colony in our laboratory. This article describes the husbandry of Cairo spiny mice, and techniques of working with them, such as optimizing the diet and housing conditions, handling and marking for individual identification, and also some reproductive parameters of the colony. We have optimized the animal diet by adding dry arthropods, an important component of the spiny mice natural diet, as well as enriched the environment by placing to each cage the running wheels, tunnels and houses. As a result, an increase in the number of animals was obtained by more than 50% over 9 months; the overall survival rate of the offspring was 98%.

Keywords: Cairo spiny mouse, *Acomys cahirinus*, husbandry, reproduction, body weight, postnatal growth