

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 74 · № 2 · 2019 · АПРЕЛЬ—ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

- Баишникова И.В., Узенбаева Л.Б., Илюха В.А., Кижина А.Г., Печорина Э.Ф., Ильина Т.Н. Сравнительно-видовое исследование влияния витаминов А и Е на лейкоцитарную формулу и морфометрические параметры лимфоцитов у хищных млекопитающих (*Carnivora*) 64
- Бондаренко С.А., Георгиева М.Л., Кокаева Л.Ю., Биланенко Е.Н. Первое обнаружение щелочеустойчивых грибов на побережье хлоридного озера Баскунчак. 73
- Давидович Н.А., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Полякова С.Л., Гастиньо Р. Очистка культур диатомовых водорослей, контаминированных кинетопластидой *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832. 80
- Калинина А.П., Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А. Антипаркинсоническая активность ингибитора пролилэндопептидазы в эксперименте у мышей 87
- Кузнецова В.М., Разумова О.В., Карлов Г.И., Данг Т.С., Крупин П.Ю., Дивашук М.Г. Некоторые особенности применения методов денатурационной и безденатурационной гибридизации *in situ* при изучении хромосом злаков . 94
- Локтюшкин А.В., Ловягина Е.Р., Семин Б.К. Взаимодействие катионов тербия с донорной стороной фотосистемы 2 высших растений 101
- Перепелкина О.В., Огиенко Н.А., Лильп И.Г., Гарбуз Д.Г., Ревещин А.В., Павлова Г.В., Полетаева И.И. Влияние однократного прогревания на поведение, нейрогенез взрослого мозга и экспрессию белка теплового шока HSP-70 у лабораторных мышей 107
- Потехина В.М., Аверина О.А., Кузьмин В.С. Суправентрикулярный миокард сердца мышей B6CBAF1 проявляет генетически обусловленную аритмогенность благодаря эктопической автоматии и триггерной активности. 115

Яковенко И.А., Шумов Д.Е., Петренко Н.Е., Козлов М.К., Дорохов В.Б. Изучение взаимодействия ритмических компонентов ЭЭГ на первой стадии дневного сна 123

Яскин В.А. Сезонная изменчивость архитектуры гиппокампа рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*, Rodentia) 129

Обзоры

Лебедев В.В., Буцан С.Б. Использование раствора Карнуа и его модификаций для уменьшения количества рецидивов после хирургического удаления кератокистозных одонтогенных опухолей и амелобластом: систематический обзор. 135

Краткие сообщения

Орехова А.В., Осмолковский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Возможность применения внеклеточной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* для определения содержания фактора X в плазме крови человека 146

CONTENTS

Research articles

- Baishnikova I.V., Uzenbaeva L.B., Ilyukha V.A., Kizhina A.G., Pechorina E.F., Ilyina T.N. Comparative research of the effect of vitamins A and E on the differential leucocyte count and the morphometric parameters of lymphocytes in carnivorous mammals (Carnivora) . 64
- Bondarenko S.A., Georgieva M.L., Kokaeva L.Y., Bilanenko E.N. First discovery of alkali-resistant fungi on the coast of chloride Lake Baskunchak 73
- Davidovich N.A., Davidovich O.I., Podunay Yu.A., Polyakova S.L., Gastineau R. Treating of diatom algae cultures contaminated with the kinetoplastid *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832 80
- Kalinina A.P., Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A. The antiparkinsonian action of the prolyl endopeptidase inhibitor in mice 87
- Kuznetsova V.M., Razumova O.V., Karlov G.I., Dang T.X., Kroupin P.Y., Divashuk M.G. Some peculiarities of application of denaturative and undenaturated D-FISH methods on chromosomes of cereals 94
- Loktyushkin A.V., Lovyagina E.R., Semin B.K. Interaction of terbium cations with the oxidizing side of photosystem II higher plants . . . 101
- Perepelkina O.V., Ogienko N.A., Lilp I.G., Garbuz D.G., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Poletaeva I.I. The effect of a single heating treatment on laboratory mice behaviour, adult neurogenesis and the expression of HSP-70. 107
- Potekhina V.M., Averina O.A., Kuzmin V.S. Supraventricular myocardium of the heart of the B6CBAF1 mice strain reveals genetically determined arrhythmogenic properties due to ectopic automaticity and triggered activity 115
- Yakovenko I.A., Shumov D.E., Petrenko N.E., Kozlov M.K., Dorokhov V.B. The study of coupling rhythmic components of the EEG during the first stage of day sleep. 123
- Yaskin V.A. Seasonal variability of the hippocamp architectonics in bank vole (*Clethrionomys glareolus*, Rodentia) 129

Review

- Lebedev V.V., Butsan S.B. Use of Carnoy's solution and its modifications for reducing the number of recurrences after surgical removal of keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas: A systematic review 135

Short communications

- Orekhova A.V., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Possibility of application of extracellular protease of micromycet *Aspergillus ochraceus* for determination of factor X content in human blood plasma. 146

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 599.74:591.111.1:577.16

**СРАВНИТЕЛЬНО-ВИДОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ
ВИТАМИНОВ А И Е НА ЛЕЙКОЦИТАРНУЮ ФОРМУЛУ И
МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИМФОЦИТОВ
У ХИЩНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (CARNIVORA)****И.В. Баишникова*, Л.Б. Узенбаева, В.А. Илюха, А.Г. Кижина,
Э.Ф. Печорина, Т.Н. Ильина**

*Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Россия, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11
e-mail: iravbai@mail.ru

Исследовали влияние витаминов А и Е на количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу и морфометрические параметры лимфоцитов у трех видов отряда Carnivora – американских темно-коричневых норок (*Neovison vison*, Mustelidae), вуалевых песцов (*Vulpes lagopus*, Canidae) и серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*, Canidae). Самое высокое количество лейкоцитов, а также наибольшая площадь поверхности лимфоцитов и их ядер наблюдались в периферической крови у норок, наименьшие показатели выявлены у лисиц. Дополнительное введение в рацион витаминов А и Е в течение 14 сут практически не повлияло на количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу, лишь снизилось относительное содержание эозинофилов и моноцитов у лисиц, получавших витамин Е. Действие витаминов в основном проявилось в изменении морфометрических параметров лимфоцитов. Добавки витамина А у норок и лисиц, а витамина Е – только у норок привели к увеличению площади поверхности лимфоцитов, а в ряде случаев и их ядер, что у норок сопровождалось повышением размеров цитоплазмы. У песцов обнаружен противоположный характер изменений – оба витамина вызвали уменьшение площади поверхности лимфоцитов и их ядер. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с иммуномодулирующим действием витаминов А и Е, а обнаруженные различия – с особенностями морфофункциональной организации лимфоцитов и иммунного статуса исследованных видов хищных млекопитающих.

Ключевые слова: витамин А, витамин Е, лейкоциты, лимфоциты, морфометрические параметры, хищные млекопитающие

Наиболее исследуемыми нутриентами, влияющими на иммунитет, являются витамины А и Е. Установлено, что как недостаток, так и избыток витамина А ухудшают иммунную функцию и устойчивость к инфекции, а дополнительное его введение в рацион приводит к изменениям неспецифического и специфического иммунитета [1]. Это частично связано с влиянием на пролиферацию и дифференцировку лейкоцитов, а также на продукцию иммуноглобулинов [2]. Витамин Е является основным жирорастворимым антиоксидантом, участвующим в защите от окислительных повреждений полиненасыщенных жирных кислот, которые в значительных количествах присутствуют в мембранах иммунных клеток [3]. Тем самым обеспечивается стабильность

мембран, что в свою очередь влияет на функционирование рецепторов, активность ферментов и межклеточные взаимодействия [4]. Кроме того, витамин Е регулирует иммунную функцию, ингибируя продукцию иммуносупрессивных компонентов, таких как простагландин Е₂, и стимулируя продукцию интерлейкина 2, участвующего в дифференцировке Т- и В-лимфоцитов [3, 5].

Применение витаминов А и Е в дозах, превышающих рекомендуемый уровень, улучшает иммунные функции у лабораторных и сельскохозяйственных животных [1, 3]. Сведения о влиянии этих витаминов на состав крови и морфофункциональное состояние лейкоцитов у хищных млекопитающих встречаются крайне редко. Интересными объектами для исследования являются

разводимые в условиях зоокультуры пушные звери, у которых устойчивость к внешним факторам и иммунореактивность сформировались в различных экологических условиях.

Американская норка (*Neovison vison*), один из наиболее популярных объектов клеточного пушного звероводства, адаптирована к обитанию вблизи водоемов и употреблению пищи с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Для этого вида характерны высокое поверхностно-весовое отношение и более интенсивный метаболизм, чем у других млекопитающих со сходной массой тела [6]. Вуалевый песец является мутантной формой дикого голубого песца (*Vulpes lagopus*), эндемика Арктики, приспособленного к низким температурам окружающей среды и недостатку пищи в холодный период года. Серебристо-черная порода лисиц создана на основе диких красных лисиц (*Vulpes vulpes*), хорошо адаптированных к разнообразным условиям обитания и имеющих самое широкое географическое распространение среди представителей отряда Carnivora.

В настоящее время, несмотря на большое количество исследований, по-прежнему актуальным является изучение иммунно-регуляторных функций витаминов А и Е. Для оценки состояния иммунитета могут быть использованы лейкоцитарная формула, являющаяся чувствительным индикатором гомеостаза, и морфометрические параметры лимфоцитов, которые обеспечивают основу специфических иммунных реакций. Морфофункциональная организация лимфоцитов периферической крови, зависящая от ряда факторов, в частности, возраста, степени дифференцировки, энзиматического спектра, а также таких процессов, как пролиферация, миграция и др., достаточно полно отражает изменение состояния лимфоидной системы.

Цель работы заключалась в исследовании влияния витаминов А и Е в разных дозах на количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу и морфометрические параметры лимфоцитов у трех видов хищных млекопитающих – норок, песцов и лисиц, разводимых в условиях зоокультуры.

Материалы и методы

Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Состав периферической крови и морфометрические параметры лимфоцитов определяли у 6–7-месячных темно-коричневых норок, вуалевых песцов и серебристо-черных лисиц. Все животные получали основной рацион (ОР) звероводства, животным экспериментальных групп дополнительно к основному рациону добавля-

ли разные дозы витаминов А (масляный раствор ретинола ацетата, Россия – песцам и лисицам, «Lutavit А 1000 Plus», Германия – норкам) или Е («Сухавит Е 50», Германия) из расчета на голову в сутки в течение 14 сут в ноябре. Экспериментальные группы формировались по принципу аналогов.

Норки содержались парами (самки и самцы). Животные были разделены на 4 группы, которые получали корм с разным уровнем витаминов: 1 – контроль (ОР, n = 6), 2 – ОР + 500 МЕ витамина А (n = 9), 3 – ОР + 4 мг витамина Е (n = 10), 4 – ОР + 20 мг витамина Е (n = 10). Самки песцов были разделены на 5 групп (n = 6): 1 – контроль (ОР), 2 – ОР + 5000 МЕ витамина А, 3 – ОР + 10000 МЕ витамина А, 4 – ОР + 50 мг витамина Е, 5 – ОР + 100 мг витамина Е. Самок лисиц разделили на 3 группы (n = 6): 1 – контроль (ОР), 2 – ОР + 10000 МЕ витамина А, 3 – ОР + 100 мг витамина Е. ОР для норок содержал 200 МЕ витамина А и 2 мг витамина Е на голову в сутки, для песцов и лисиц – 15 мг витамина Е на голову в сутки, что является нормой для зверей осенью. Забор крови (без антикоагулянта) осуществляли утром натощак у норок из кончика хвоста, у песцов и лисиц – из плантарной вены.

Общее число лейкоцитов подсчитывали общепринятым методом в камере Горяева. Определение относительного содержания и исследование морфологических особенностей лимфоцитов проводили на мазках периферической крови, окрашенных по Паппенгейму. В работе использовали световой микроскоп Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES, Pixera Corporation, США) и компьютерной системой анализа изображений «ВидеоТест-Морфология» (ВидеоТест, Россия). Морфометрические параметры – размеры лимфоцитов (ядра и клетки), а также доля площади, занимаемой ядром, определены у 1031 лимфоцита норок, 699 лимфоцитов лисиц, а также у 1550 лимфоцитов песцов.

Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов программ MS Office Excel 2007 и Statgraphics 5.0 общепринятыми методами вариационной статистики. Характер распределения полученных результатов проверяли по критерию хи-квадрат. Оценку достоверности различий показателей проводили с применением критериев Вилкоксона-Манна-Уитни и Стьюдента. Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Результаты и обсуждение

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о различиях в содержании лейкоцитов

Таблица 1

Количество лейкоцитов и состав лейкоцитарной формулы периферической крови темно-коричневых норок, вуалевых песцов и серебристо-черных лисиц при различных дозах витаминов А и Е

Группы животных	Показатели	Лейкоциты 10 ⁹ /л	Лейкоцитарная формула					
			Л	М	П	С	Э	Б
Норки								
Контроль	M±m	7,47±1,40	36,17±3,70	6,67±1,05	1,67±0,61	54,50±3,65	0,83±0,40	0,17±0,17
	Медиана (min-max)	7,28 (3,90-12,90)	38,00 (21-48)	6,50 (3-10)	1,00 (0-4)	55,00 (40-68)	0,50 (0-2)	0 (0-1)
Витамины: А 500 МЕ	M±m	6,75±0,66	35,22±4,23	7,00±1,03	2,11±0,48	54,22±4,47	1,22±0,40	0,22±0,15
	Медиана (min-max)	6,45 (4,65-11,03)	32,00 (20-57)	7,00 (2-12)	2,00 (0-5)	58,00 (28-68)	1,00 (0-3)	0 (0-1)
Е 4 мг	M±m	7,50±1,02	32,30±3,54	9,20±1,40	4,30±1,07	52,60±3,77	1,30±0,68	0,30±0,21
	Медиана (min-max)	7,30 (3,75-14,35)	30,50 (21-53)	9,00 (2-17)	4,00 (1-12)	55,00 (34-74)	0,50 (0-7)	0 (0-2)
Е 20 мг	M±m	5,92±1,01	28,00±4,12	9,78±0,89	2,33±0,58	59,11±4,15	0,67±0,29	0,11±0,11
	Медиана (min-max)	5,55 (3,40-13,15)	31,00 (4-46)	10,00 (5-14)	2,00 (1-6)	54,00 (42-82)	0 (0-2)	0 (0-1)
Песцы								
Контроль	M±m	5,87±0,43	53,33±4,90	7,50±0,88	3,33±0,21	32,67±4,26	3,00±0,86	0,17±0,17
	Медиана (min-max)	5,55 (4,95-7,95)	48,50 (44-73)	7,00 (5-11)	3,00 (3-4)	34,00 (15-44)	2,50 (1-6)	0 (0-1)
Витамины: А 5000 МЕ	M±m	6,66±0,44	49,67±2,32	10,00±1,26	6,50±1,38	29,33±3,30	4,33±1,26	0,17±0,17
	Медиана (min-max)	6,55 (5,25-7,70)	47,00 (44-60)	10,50 (8-15)	8,00 (5-11)	28,00 (20-35)	4,50 (1-9)	0 (0-1)
А 10000 МЕ	M±m	7,68±0,26	53,83±3,36	8,50±2,00	5,33±1,33	29,00±3,13	3,33±1,56	0
	Медиана (min-max)	7,85 (7,05-8,45)	51,00 (46-69)	7,00 (3-17)	5,50 (2-10)	27,50 (21-41)	2,00 (1-11)	0
Е 50 мг	M±m	5,25±0,52	43,50±5,37	7,33±1,41	5,83±1,11	38,17±3,56	5,17±1,17	0
	Медиана (min-max)	5,08 (3,90-6,75)	38,50 (29-60)	9,00 (2-12)	5,00 (3-10)	40,50 (25-49)	5,50 (1-9)	0
Е 100 мг	M±m	6,18±0,55	51,67±5,04	7,50±1,95	3,33±0,49	35,67±3,80	1,83±0,70	0
	Медиана (min-max)	5,83 (4,35-8,15)	52,00 (31-66)	6,50 (1-15)	3,50 (2-5)	35,00 (25-50)	2,00 (0-4)	0
Лисицы								
Контроль	M±m	5,20±0,24	36,17±8,06	9,83±1,17	8,17±1,38	40,33±6,24	5,50±0,56	0
	Медиана (min-max)	5,35 (4,05-5,80)	33,50 (16-67)	9,50 (7-13)	8,00 (4-12)	41,50 (18-58)	6,00 (3-7)	0
Витамины: А 10000 МЕ	M±m	5,27±0,51	45,67±5,08	7,33±1,28	5,33±1,31	37,33±3,08	4,33±1,09	0
	Медиана (min-max)	5,25 (3,85-7,00)	43,00 (29-62)	7,50 (3-11)	5,50 (0-9)	38,50 (29-49)	3,50 (1-8)	0
Е 100 мг	M±m	4,94±0,33	40,00±1,86	6,67±0,99*	7,83±1,14	42,83±2,55	2,67±0,61*	0
	Медиана (min-max)	4,80 (4,05-6,15)	40,50 (32-45)	6,50 (4-11)	8,00 (5-11)	43,00 (34-52)	2,00 (1-5)	0

Пояснения: Л – лимфоциты, М – моноциты, П – палочкоядерные нейтрофилы, С – сегментоядерные нейтрофилы, Э – эозинофилы, Б – базофилы. * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (p < 0,05)

и их отдельных типов в периферической крови у исследуемых видов животных. Количество лейкоцитов находилось в диапазоне, обнаруженном у других видов хищных, разводимых в условиях зоокультуры [7]; у норок оно было выше, чем у песцов и лисиц. На светомикроскопическом уровне межвидовых различий в морфологии лейкоцитов, за исключением эозинофилов, не наблюдалось. У лисиц и песцов гранулы в эозинофилах крупнее и количество их меньше, чем у норок. Проведенные нами микроскопические исследования подтверждают данные о видовых особенностях эозинофилов среди млекопитающих [8].

У хищных млекопитающих в естественной среде обитания выявлена корреляция между количеством лейкоцитов и некоторыми экологическими и поведенческими характеристиками, которые влияют на риск заражения. В частности, у некоторых видов обнаружена связь между моногамией и сравнительно низким уровнем лейкоцитов, тогда как повышенное содержание этих клеток выявлено у полигамных животных [9]. В основе сравнительно низкого количества лейкоцитов могут быть большая эффективность и/или более низкий

уровень базального метаболизма [10].

Лимфоциты периферической крови млекопитающих визуально обычно подразделяют на малые, средние и большие или узко- средне- и широкоцитоплазматные. У норок, песцов и лисиц наблюдаются лимфоциты разного размера с относительно гладким рельефом клетки. Морфометрический анализ показал наличие различий в параметрах лимфоцитов между исследованными видами (табл. 2, рис. 1). Самая большая площадь поверхности лимфоцитов и их ядер выявлена у норок, значительно меньшая – у лисиц, песцы по этим показателям занимают промежуточное положение. Гистограммы распределения лимфоцитов по площади у всех видов унимодальные, асимметричные с незначительным отклонением в сторону больших величин (рис. 2).

У норок площадь поверхности около 90 мкм² имели 48% лимфоцитов, при этом в популяции присутствовало незначительное количество клеток с площадью до 200 мкм². У лисиц и песцов большая часть лимфоцитов имела площадь около 70 мкм², причем у лисиц их доля достигала примерно 67%, а у песцов – только 50%. Как видно

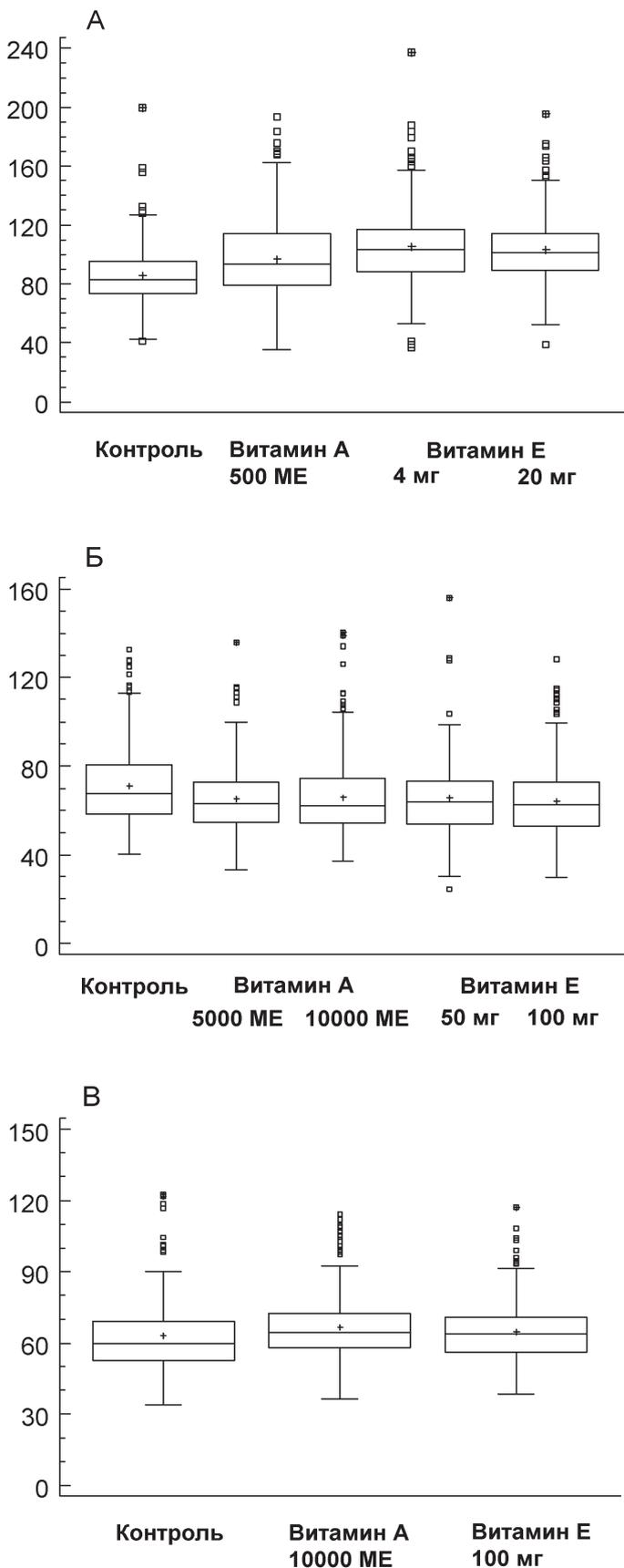


Рис. 1. Площадь поверхности лимфоцитов периферической крови у темно-коричневых норок (А), вуалевых песцов (Б) и серебристо-черных лисиц (В) при различных дозах витаминов А и Е. По оси абсцисс – группы животных; по оси ординат – площадь поверхности, μm^2 . + – среднее, — — медиана, □ – 25%–75%, I – статистический диапазон, □ – выпадающие варианты.

из гистограмм, лимфоциты норок по сравнению с лимфоцитами лисиц и песцов сильно варьируют по величине площади поверхности, у них особенно увеличена доля больших клеток. Среди них лимфоциты с азурофильными гранулами, относящиеся к естественным киллерам (NK-клетки), встречались крайне редко. Исходя из данных витальной компьютерной морфометрии, степень увеличения диаметра, периметра и площади при снижении фазовой высоты соответствует уровню активности внутриклеточных процессов, а величины фазовой высоты и объема ядерных структур – отражает увеличение пролиферативного потенциала клетки [11].

Известно, что популяция лимфоцитов гетерогенна по многим параметрам – иммунологическим, цитохимическим, морфометрическим и др. Исходя из морфологических наблюдений, нельзя сделать заключение об их субпопуляционном составе. Однако, учитывая понятие функциональной морфологии, можно предположить, что установленные у трех видов хищных млекопитающих различия в величине лимфоцитов могут отражать особенности их морфофункционального состояния. Увеличенное количество лимфоцитов большого размера у норок, по-видимому, связано со спецификой иммунореактивности этого вида. Норки при domestikации кроме селекции по поведению, подверглись сильному стрессу, связанному со сменой среды обитания – от полуводного образа жизни к условиям зверофермы. При клеточном содержании у норок, а не у их диких предков или других разводимых в зоокультуре видов хищных распространилась алеутская болезнь (вирусный плазмозитоз). Это медленно развивающаяся инфекция, характеризующаяся увеличением количества цитотоксических Т-клеток – CD8-положительных лимфоцитов [12].

В реакции исследуемых видов животных на дополнительное введение в рацион витаминов А и Е имелись некоторые особенности. На общее содержание лейкоцитов витамины А и Е существенно не повлияли (табл. 1), лейкоцитарный профиль у норок и песцов также не изменился. У лисиц, получавших витамин Е в дозе 100 мг, обнаружено снижение ($p < 0,05$) относительного содержания моноцитов, являющихся источником тканевых макрофагов и активных форм кислорода, и эозинофилов, которые играют важную роль при аллергическом воспалении. Это может быть результатом участия α -токоферола в механизме регуляции адгезии моноцитов к эндотелию, а также трансэндотелиальной миграции эозинофилов при аллергии [4].

Под влиянием витаминов значительно изменились параметры лимфоцитов (табл. 2, рис. 1, А–В). У норок и лисиц витамин А вызвал уве-

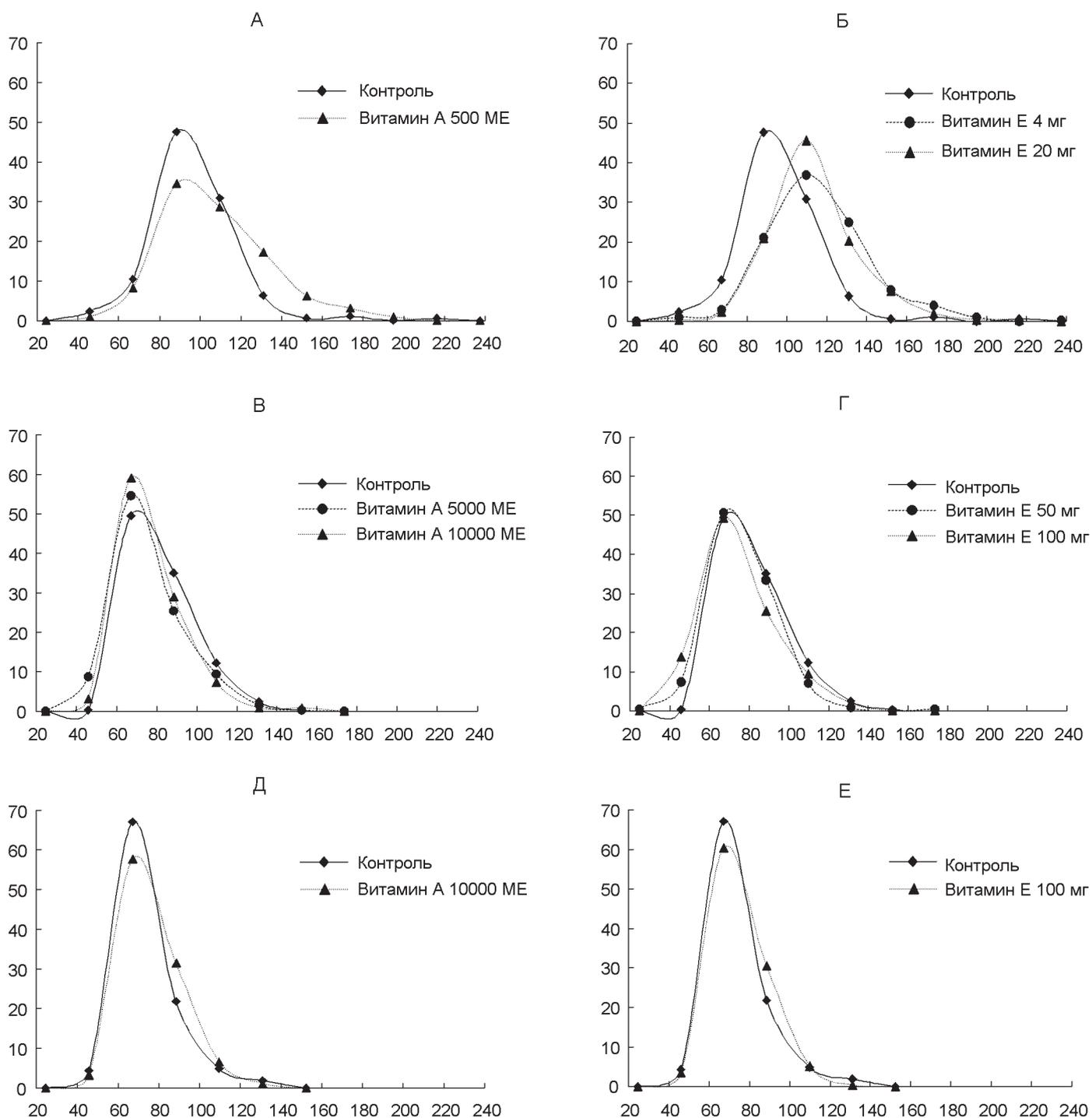


Рис. 2. Гистограммы распределения лимфоцитов периферической крови по площади у темно-коричневых норок (А, Б), вуалевых песцов (В, Г) и серебристо-черных лисиц (Д, Е) при различных дозах витаминов А и Е. По оси абсцисс – площадь поверхности, μm^2 ; по оси ординат – частота встречаемости, %.

личение площади поверхности клеток ($p < 0,05$). Особенно отчетливо это было выражено у норок за счет появления широкоцитоплазматических лимфоцитов и снижения доли средних, что на гистограмме совпадает с усилением асимметрии в сторону больших величин (рис. 2, А). У лисиц в условиях добавок витамина А при аналогичных изменениях площади поверхности лимфоцитов обнаружено также достоверное увеличение размера ядер.

Витамин Е у норок вызвал сходные изменения морфометрических параметров лимфоцитов. При использовании двух доз витамина Е – 4 и 20 мг – наблюдалось существенное повышение площади поверхности клеток, а при дозе 4 мг – и их ядер (табл. 2). На гистограмме видно, что в подопытных группах кривые распределения лимфоцитов по площади смещены вправо, так как в популяции повысилось количество более крупных клеток, среди которых большая часть имела раз-

мер около 110 мкм², и уменьшилась доля малых лимфоцитов (рис. 2, Б). У лисиц, получавших дополнительный витамин Е, не обнаружено достоверных изменений параметров лимфоцитов, хотя, как следует из гистограммы, наблюдались незначительные сдвиги в количестве клеток среднего размера (рис. 2, Е).

У песцов реакция на витамины А и Е отличалась от наблюдаемой у норок и лисиц и заключалась в снижении площади поверхности лимфоцитов и их ядер (табл. 2). На гистограммах это

ципы, даже у близкородственных видов имеются отличия в организации иммунной системы. Следует отметить, что изменения морфометрических параметров лимфоцитов у песцов и лисиц, в отличие от норок, происходили на фоне значительного увеличения в крови уровня ретинола, а в группах лисиц и песцов, получавших 5000 МЕ витамина А, и снижения концентрации α -токоферола [14, 15].

Учитывая чувствительность лимфоцитов к иммуноактивным препаратам, а также характер

Таблица 2

Морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови темно-коричневых норок, вуалевых песцов и серебристо-черных лисиц при различных дозах витаминов А и Е

Группы животных	Показатели	Площадь клетки, мкм ²	Площадь ядра, мкм ²	Площадь, занимаемая ядром, %
Норки				
Контроль (n=172) Витамины: А 500 МЕ Е 4 мг (n=317) Е 20 мг (n=252)	M±m	85,80±1,58	61,26±0,91	72,53±0,67
	Медиана (min-max)	82,70 (40,64-199,46)	60,46 (31,26-113,34)	72,51 (46,62-97,02)
	M±m	96,84±1,54***	62,08±0,69	66,16±0,63***
	Медиана (min-max)	93,56 (35,13-193,64)	61,08 (30,20-115,07)	67,33 (39,65-92,03)
	M±m	105,12±1,44***	66,13±0,72***	64,21±0,53***
Медиана (min-max)	103,21 (36,70-237,58)	65,44 (20,48-113,97)	64,63 (37,59-90,71)	
M±m	102,98±1,40***	61,36±0,64	60,86±0,60***	
Медиана (min-max)	100,91 (38,67-195,24)	60,86 (26,71-93,85)	61,76 (36,45-96,01)	
Песцы				
Контроль (n=325) Витамины: А 5000 МЕ Е 50 мг (n=260) Е 100 мг (n=298)	M±m	71,10±0,93	54,94±0,54	78,37±0,37
	Медиана (min-max)	67,20 (40,18-132,51)	53,17 (35,78-91,96)	79,10 (56,97-97,86)
	M±m	65,22±0,92***	49,87±0,60***	77,30±0,35
	Медиана (min-max)	62,74 (33,04-135,63)	48,50 (24,40-106,72)	77,60 (55,54-94,24)
	M±m	66,15±0,86***	50,20±0,49***	77,02±0,36*
Медиана (min-max)	66,15±0,86***	48,83 (30,04-101,25)	77,89 (50,11-91,28)	
M±m	65,61±1,04***	49,02±0,68***	75,54±0,42***	
Медиана (min-max)	63,92 (24,54-155,85)	48,02 (20,75-124,90)	76,02 (50,70-92,71)	
M±m	64,40±1,01***	48,38±0,58***	76,58±0,45**	
Медиана (min-max)	62,49 (29,81-128,06)	47,25 (25,57-77,65)	76,29 (56,63-96,77)	
Лисицы				
Контроль (n=207) Витамины: А 10000 МЕ Е 100 мг (n=235)	M±m	63,10±1,03	47,60±0,56	76,64±0,54
	Медиана (min-max)	59,93 (33,89-122,33)	47,34 (25,67-76,14)	76,78 (48,89-96,66)
	M±m	66,53±0,87*	49,52±0,47**	75,44±0,46
	Медиана (min-max)	64,27 (36,66-114,14)	48,79 (29,97-75,46)	75,52 (50,46-94,50)
	M±m	64,63±0,82	48,80±0,49	76,30±0,46
Медиана (min-max)	63,65 (38,59-116,99)	48,28 (30,84-71,69)	77,05 (53,88-94,71)	

Пояснения: n – количество лимфоцитов, параметры которых измерены. *, **, *** – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

соответствует повышению доли относительно мелких клеток площадью около 45 мкм² преимущественно в группах, получавших витамин Е, и средних – при дополнительных дозах витамина А. При этом количество крупных лимфоцитов площадью 88 мкм² и более также уменьшалось (рис. 2, В, Г). Большинство малых лимфоцитов принадлежит к иммунологически зрелым, в основном длительно живущим клеткам, которые постоянно мигрируют между кровью и лимфой, обеспечивая высокий защитный потенциал организма [13]. Выявленные у песцов особенности, по-видимому, отражают видовую специфику изменения иммунного статуса, так как, несмотря на общие прин-

изменений морфометрических параметров, можно предположить, что они обусловлены иммуномодулирующим действием исследуемых витаминов. Установлено важное значение витамина А для развития и поддержания иммунной системы и его влияние на процессы пролиферации, дифференцировки, а также апоптоз иммунокомпетентных клеток [16, 17]. Действие ретиноевой кислоты, активного метаболита витамина А, на популяционный состав связано с ускорением дифференцировки В-лимфоцитов [2], участием в развитии Т-хелперов (Th) и увеличением продолжительности жизни активированных Т-клеток [16].

В отношении витамина Е также продемон-

стрирована иммуномодулирующая и противовоспалительная эффективность. По мнению некоторых авторов, он относится к иммуно-гомеостатическим факторам [4] и способен регулировать функционирование сигнальных систем клетки и модулировать транскрипцию генов [18]. Выявлено, что влияние витамина Е на лимфоциты связано с воздействием на экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, а также баланса между субпопуляциями Th [5]. В высоких дозах α -токоферол активирует кластеры генов, участвующих в T-клеточном иммунном ответе [19].

Полученные результаты свидетельствуют об определенном сходстве в действии витаминов А и Е, а также о межвидовых различиях в характере вызываемых ими изменений морфометрических параметров лимфоцитов. У норки и лисиц, как правило, в циркуляции увеличивалось количество клеток более крупного размера, а у песцов – мелких и средних. По-видимому, изменения в соотношении лимфоцитов разного размера у животных, получавших витамины, отражают процесс преобразования структуры популяции. В результате этого в группах песцов и лисиц, получавших витамины А и Е, средние размеры лимфоцитов стали равными. По некоторым данным, изменение диаметра, периметра и площади лимфоцитов может быть связано с популяционной перестройкой в иммунной системе и появлением групп клеток с иными размерами, характеризующими состояние внутриклеточного метаболизма и содержание белкового вещества в клетке [11].

На функции иммуннокомпетентных клеток витамины могут влиять, регулируя текучесть биологических мембран [20]. В предыдущем исследовании нами было установлено, что добавки витамина А в рацион песцов приводят у небольшой части лимфоцитов периферической крови к изменению поверхностной архитектоники – формированию сфероидных выпячиваний [21]. В определенной степени это может зависеть как от активационных, так и апоптотических процессов, а также структурных особенностей мембран лимфоцитов, в том числе и их липидного спектра. Было показано, что у исследуемых видов имеются различия в липидном составе клеточных мембран некоторых клеток. Так, у лисиц гепатоциты

и сперматозоиды отличаются большим содержанием ряда полиненасыщенных жирных кислот, а сперматозоиды также более высоким соотношением ненасыщенных и насыщенных жирных кислот, чем у песцов [22, 23]. Надо отметить, что при сходном кормлении внутренний жир песка содержит большее количество насыщенных жирных кислот, чем у норки [24], а способность песка к накоплению витамина Е в организме превосходит таковую лисиц [25].

Сопоставить результаты нашего исследования с данными иммунологической идентификации лимфоцитов не представляется возможным в виду недостаточной изученности структурно-функциональной организации иммунокомпетентной системы у различных видов млекопитающих (кроме лабораторных животных). Согласно последним данным, эффект влияния витаминов, продемонстрированный *in vitro*, не всегда применим к ситуации *in vivo* [18].

Таким образом, лимфоциты периферической крови трех видов хищных млекопитающих, разводимых в условиях зоокультуры, различались по морфометрическим параметрам и чувствительности к витаминам А и Е. Дополнительное введение в рацион витамина А у норки и лисиц и витамина Е только у норки вызывало увеличение площади поверхности лимфоцитов и их ядер. У песцов изменения носили противоположный характер – при добавках витаминов А и Е наблюдалось снижение морфометрических параметров. Действие витаминов А и Е привело к изменению распределения в периферической крови лимфоцитов по размеру, а возможно, и их морфофункционального состояния и, соответственно, иммунного статуса исследованных видов животных.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № 0218-2019-0073).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Этической комиссией Института биологии КарНЦ РАН. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ross A.C., Chen Q., Ma Y. Vitamin A and retinoic acid in the regulation of B-cell development and antibody production // *Vitam. Horm.* 2011. Vol. 86. N 5. P. 103–126.

2. Chen X., Esplin B.L., Garrett K.P., Welner R.S., Webb C.F., Kincaid P.W. Retinoids accelerate B lineage lymphoid differentiation // *J. Immunol.* 2008. Vol. 180. N 1. P. 138–145.

3. Pekmezci D. Vitamin E and immunity // Vitam. Horm. 2011. Vol. 86. N 8. P. 179–215.
4. Galli F., Azzi A., Birringer M., Cook-Mills J.M., Eggersdorfer M., Frank J., Cruciani G., Lorkowski S., Özer N.K. Vitamin E: Emerging aspects and new directions // Free Radic. Biol. Med. 2017. Vol. 102. P. 16–36.
5. Han S.N., Adolfsson O., Lee C.-K., Prolla T.A., Ordovas J., Meydani S.N. Vitamin E and gene expression in immune cells // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004. Vol. 1031. N 1. P. 96–101.
6. Korhonen H.T., Huuki H. Effect of carotenoid supplement on production performance in mink (*Neovison vison*) // Open J. Vet. Med. 2015. Vol. 5. N 4. P. 73–79.
7. Berestov V., Brandt A. Erythrocytes and leucocytes // Haematology and clinical chemistry of fur animals / Ed. A. Brandt. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 1989. P. 22–33.
8. Salakij C., Salakij J., Narkkong N.A., Prihirunkit K., Kamolnorrath S., Apibal S. Haematology, cytochemical and ultrastructural characteristics of blood cells in leopard (*Panthera pardus*) // Comp. Clin. Pathol. 2009. Vol. 18. N 2. P. 153–161.
9. Nunn C.L., Gittleman J.L., Antonovics J. A comparative study of white blood cell counts and disease risk in carnivores // Proc. R. Soc. Lond. B. 2003. Vol. 270. N 1513. P. 347–356.
10. Scanes C.G. Allometric and phylogenetic comparisons of circulating leukocyte concentrations between and within birds and mammals // Int. J. Vet. Health Sci. Res. 2016. Vol. 4. N 4. P. 116–122.
11. Валов А.Л., Василенко И.А., Ватазин А.В., Троянский И.В., Метелин В.Б., Цалман А.Я., Вишенская Т.В. Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов как неинвазивный метод диагностики острого отторжения почечного аллотрансплантата // Альманах клин. мед. 2009. № 20. С. 77–82.
12. Aasted B. Mink infected with Aleutian disease virus have an elevated level of CD8-positive T-lymphocytes // Vet. Immunol. Immunopathol. 1989. Vol. 20. N 4. P. 375–385.
13. Алмазов В.А., Афанасьев Б.В., Зарицкий А.Ю., Мамаев Н.Н., Рудакова Т.Л., Фрейдлин И.С., Цвейбах А.С., Шишков А.Л. Физиология лейкоцитов человека. Л.: Наука, 1979. 232 с.
14. Узенбаева Л.Б., Баишникова И.В., Кижина А.Г., Ильина Т.Н., Илюха В.А., Тютюнник Н.Н. Морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови лисиц (*Vulpes vulpes* L.) и песцов (*Alopex lagopus* L.) при влиянии различных доз витаминов А и Е // Труды КарНЦ РАН, 2014. № 5. С. 78–85.
15. Baishnikova I., Sergina S., Ilyina T. Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol status and tissue antioxidants in American minks (*Neovison vison*) // Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2018. Vol. 42. N 6. P. 642–648.
16. Engedal N., Ertesvag A., Blomhoff H.K. Survival of activated human T lymphocytes is promoted by retinoic acid via induction of IL-2 // Int. Immunol. 2004. Vol. 16. N 3. P. 443–453.
17. Hall J.A., Grainger J.R., Spencer S.P., Belkaid Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity // Immunity. 2011. Vol. 35. N 1. P. 13–22.
18. Azzi A. Many tocopherols, one vitamin E // Mol. Aspects Med. 2018. Vol. 61. P. 92–103.
19. Zingg J.-M., Han S.N., Pang E., Meydani M., Meydani S.N., Azzi A. In vivo regulation of gene transcription by alpha- and gamma-tocopherol in murine T lymphocytes // Arch. Biochem. Biophys. 2013. Vol. 538. N 2. P. 111–119.
20. Viti V., Cicero R., Callari D., Guidoni L., Billitteri A., Sichel G. Effect of lipophilic vitamins on the erythrocyte membrane. ^{31}P NMR and fluorescence studies // FEBS Lett. 1983. Vol. 158. N 1. P. 36–40.
21. Узенбаева Л.Б., Баишникова И.В., Кижина А.Г., Ильина Т.Н., Илюха В.А., Тютюнник Н.Н. Морфологические особенности лимфоцитов периферической крови песцов при введении витаминов А и Е в различных дозах // Морфология. 2013. № 3. С. 39–44.
22. Miller R.R. Jr., Cornett C.L., Waterhous K.E., Farstad W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation // Cryobiology. 2005. Vol. 51. N 1. P. 66–75.
23. Rouvinen K. Dietary effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on body fat composition and health status of farm-raised blue and silver foxes // Acta Agric. Scand. 1991. Vol. 41. N 4. P. 401–414.
24. Rouvinen K., Kiiskinen T. Influence of dietary fat source on the body fat composition of mink (*Mustela vison*) and blue fox (*Alopex lagopus*) // Acta Agric. Scand. 1989. Vol. 39. N 3. P. 279–288.
25. Пина Т.Н., Баишникова И.В. Species-specific features of tocopherol content in carnivorous mammals in autumn // J. Evol. Biochem. Phys. 2015. Vol. 51. N 1. P. 41–47.

Поступила в редакцию 14.01.2019 г.
После доработки 14.03.2019 г.
Принята в печать 22.03.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

COMPARATIVE RESEARCH OF THE EFFECT OF VITAMINS A AND E ON THE DIFFERENTIAL LEUCOCYTE COUNT AND THE MORPHOMETRIC PARAMETERS OF LYMPHOCYTES IN CARNIVOROUS MAMMALS (CARNIVORA)

I.V. Baishnikova*, L.B. Uzenbaeva, V.A. Ilyukha, A.G. Kizhina, E.F. Pechorina, T.N. Ilyina

Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya St. 11, Petrozavodsk, 185910, Russia

*e-mail: iravbai@mail.ru

The study of the effect of vitamins A and E on total and differential leukocyte count as well as morphometric parameters of lymphocytes in three carnivorous species – dark-brown American mink (*Neovison vison*, Mustelidae), blue fox (*Vulpes lagopus*, Canidae) and silver fox (*V. vulpes*, Canidae) was conducted. The highest total leukocyte count (WBC) and the largest surface area of lymphocytes and their nuclei in the peripheral blood were observed in mink, the lowest indices were found in silver fox. Supplementation with vitamins A and E for 14 days had no effect on the WBC and differential leukocyte count with the exception of decreasing in relative eosinophils and monocytes content in silver fox receiving vitamin E. The action of vitamins was mainly manifested in changes in the morphometric parameters of lymphocytes. Additional vitamin A in mink and silver fox and vitamin E only in mink led to an increase in the surface area of lymphocytes, and in some cases their nuclei, which was accompanied by a rise in the size of cell cytoplasm in mink. In blue fox, on the contrary, both vitamins brought about a decrease in the surface area of the lymphocytes and their nuclei. The observed changes may be related to the immunomodulatory effects of vitamins A and E, the found differences may be associated with the features of the morpho-functional organization of lymphocytes and the immune status of the studied species of carnivorous mammals.

Keywords: *vitamin A, vitamin E, leukocytes, lymphocytes, morphometric parameters, carnivorous mammals*

Сведения об авторах

Баишникова Ирина Валерьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: iravbai@mail.ru

Узенбаева Людмила Борисовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: uzenb@bio.krc.karelia.ru

Илюха Виктор Александрович – докт. биол. наук, директор Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: ilyukha@krc.karelia.ru

Кижина Александра Геннадьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: golubewa81@yandex.ru

Печорина Эльвира Филипповна – гл. биолог Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: elvi1955@yandex.ru

Ильина Татьяна Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 582.28

ПЕРВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ЩЕЛОЧЕУСТОЙЧИВЫХ ГРИБОВ НА ПОБЕРЕЖЬЕ ХЛОРИДНОГО ОЗЕРА БАСКУНЧАК

С.А. Бондаренко^{1,2,*}, М.Л. Георгиева^{1,3}, Л.Ю. Кокаева¹, Е.Н. Биланенко¹

¹Кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2;

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

*e-mail: bond.sonia@gmail.com

Статья посвящена первому исследованию щелочеустойчивых грибов в условиях нейтрального засоления на примере хлоридного озера Баскунчак (Астраханская область, Россия). Проведены: выделение грибов из хлоридных почв побережья озера на щелочной агар (рН 10,0–10,5); их идентификация с использованием морфолого-культуральных и молекулярно-генетических признаков; филогенетический анализ и исследование характера адаптации к факторам рН, солености. Показано, что щелочеустойчивые грибы на побережье озера – полифилетическая группа аскомицетов из классов Sordariomycetes (9 видов), Dothideomycetes (5 видов), Eurotiomycetes (3 вида), а также стерильные мицелии (15 изолятов). Изучение роста грибов в широком диапазоне значений рН показало, что среди изолятов есть как алкалотолерантные грибы, так и алкалофильные. Подтверждена устойчивость изолятов к повышенным концентрациям хлористого натрия. Неожиданным стало обнаружение в условиях нейтрального засоления редкой группы грибов – облигатных алкалофилов. Проведены филогенетические построения, облигатно алкалофильные изоляты охарактеризованы как новый вид рода *Sodiomyces*. Обсуждается возможная экологическая роль щелочеустойчивых грибов в засоленных местообитаниях.

Ключевые слова: экстремофилы, алкалофильные грибы, алкалотолерантные грибы, *Sodiomyces*, соленые озера, озеро Баскунчак, галотолерантные грибы

Направление исследования грибов, способных развиваться в крайне щелочных условиях, достаточно новое для микологии. Его активное развитие приурочено к началу XXI века [1–6]. У грибов обнаружены разные типы адаптации к высоким значениям рН: алкалотолеранты могут развиваться в щелочных условиях, но предпочитают нейтральные или кислые значения рН среды, алкалофилы предпочитают щелочные значения рН выше 8. Если грибы могут расти в кислых условиях (при рН до 5–5,5), они считаются факультативными алкалофилами, если же способность к росту в кислых условиях утрачена, такие грибы называют облигатными алкалофилами. Предыдущие исследования показали, что облигатная алкалофилия – редкое явление среди грибов, оно подтверждено для родов *Thielavia* и *Sodiomyces*. Распространение облигатных алкалофилов связывают со стабильно щелочными почвами содовых озер и солончаков, где значения рН держатся на уровне 10–12 [5]. Факультативные алкалофилы

и алкалотолеранты распространены шире, они встречаются даже в кислых и нейтральных почвах [7], где такое звено деструкторов востребовано при локальном защелачивании.

До настоящего времени комплексных исследований (которые бы включали молекулярно-генетическую идентификацию и физиологическую характеристику) щелочеустойчивого звена микобиоты в условиях нейтрального засоления не проводилось. Озеро Баскунчак (Россия) – объект мирового значения, уникальное месторождение пищевой соли, запас которой ежегодно восстанавливается за счет поступления природных высокоминерализованных растворов и последующего их испарения в котловине озера в течение летнего периода. Поверхностные залежи соли на озере составляют 10–18 м, в то время как общая глубина залегания соли достигает 6 км. Значения рН воды озера околонеутральные (6–7), общее содержание растворенных солей около 390 г/л [8, 9]. По концентрации растворенных солей это

озеро Астраханской области России сравнимо с Мертвым морем в Израиле, хотя состав солей у них различен. Исследованию галофильных и галотолерантных микромицетов из Мертвого моря посвящен ряд работ [10–13]. Мицелиальные и дрожжевые грибы были выделены из воды и окружающей почвы, среди них наиболее часто встречались виды из родов *Aspergillus* и *Eurotium* [13, 14]. Большинство изолированных из воды и почвы видов распространены широко и относятся к эвритопным видам, *Gymnascella marismortui* отнесена к эндемичным видам. Среди грибов побережья не были обнаружены галофильные и термофильные изоляты [14]. Результаты обширных исследований свидетельствуют о том, что прямых доказательств гетеротрофной активности выявленных грибов в районе Мертвого моря нет, однако предполагается возможное локальное и временное их влияние на экосистему озера за счет активных ферментов [13].

Данные по микобиоте озера Баскунчак (как воды озера, так и прибрежной почвы) на удивление единичны [9, 12]. Подобного рода исследования актуальны в свете растущего интереса к экологии, эволюции и биотехнологическому потенциалу экстремофильных организмов.

Материалы и методы

Материалы. Материал собран на побережье хлоридного озера Баскунчак (Астраханская область, Россия, N48.21° E46.84°) в июне 2016 г. Всего было отобрано 20 образцов следующих субстратов – почва под кустарником *Halocnemum strobilaceum* в 5–6 м от уреза воды; верхний слой соли, песчанисто-глинистая почва и песок в зоне заплеска (не более 50 см от воды); илистые донные отложения до 50 см глубиной в двух метрах от берега. Верхний (5 см) слой субстрата собирали в крафтовые пакеты, высушивали. Для каждого образца измеряли pH в лабораторных условиях.

Методы выделения, культивирования и хранения микромицетов. Для селективного выделения и культивирования щелочеустойчивых грибов использовали щелочной агар на основе суслы и карбонатно-бикарбонатного буфера (ЩА; pH 10,2) с добавлением антибиотика рифампицина (2 г/л) [5]. Посев проводили методом почвенных комочков (около 2 г почвы на 3 чашки Петри), чашки инкубировали при температуре 24°C. Для каждого выделенного вида грибов определяли встречаемость (как отношение числа образцов, в которых отмечен вид, к общему числу образцов, выраженное в %). Получены моноспоровые культуры всех изолятов. Культуры включены в коллекцию грибов экстремальных местообитаний кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Часть культур депонирована в коллекцию

CBS (Утрехт, Нидерланды).

Идентификация изолятов по морфолого-культуральным признакам. Для идентификации микромицетов, выделенных в чистую культуру, использовали определители и статьи по таксономии грибов отечественных и зарубежных авторов. Названия и систематическое положение грибов в статье приведены в соответствии с базой Species Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org/>). Для изучения микроморфологии использовали как световой микроскоп (СМ), так и сканирующий электронный микроскоп (СЭМ).

Идентификация изолятов молекулярными методами. Выделение ДНК и амплификацию проводили на базе лаборатории фитопатологии кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова и на базе отдела эволюционной биохимии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

Биомассу мицелия наращивали на чашках Петри на целлофановой мембране. Для выделения ДНК брали около 0,1 г сырого мицелия. Экстракцию проводили при помощи набора реагентов Diatom DMA Prep 100 (Изоген, Россия), следуя инструкции производителя.

Были проанализированы последовательности гена, кодирующего транскрибируемый спейсерный участок ядерной рибосомальной ДНК (ITS rDNA). Итоговая смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР) содержала на 20 мкл: 2 мкл 10X буфера Encyclo (Евроген, Россия), 0,4 мкл 50X dNTP, по 0,5 мкл 10 пМ праймеров (ITS1f TCC GTAGGTGAACCTTGCGTCCTCCGCTTATTGATA TGC и ITS4r TCCTCCGCTTATTGATATGC или 18d05 GTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCCG и 28r3-3v2 ACTCCTYRGTCCTGTTTCA), 0,4 мкл 10X полимеразы Encyclo (Promega, США), 1 мкл ДНК образца. Амплификацию проводили по схеме: 3 мин при 95°C; 35 циклов по 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 1,5 мин при 72°C. В конце ПЦР-смесь выдерживалась еще 5 мин при 72°C. Продукты амплификации просматривали на 0,7–1%-ном агарозном геле с бромистым этидием и очищали методом прямого переосаждения ДНК в мягких условиях (<http://www.genome-centre.ru/cleaning.html>). Секвенирование проводилось в центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта) с прямыми и обратными праймерами.

Видовую принадлежность определяли с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и филогенетических построений для отдельных изолятов методами байесовского анализа и максимального правдоподобия [7].

Исследование особенностей физиологии. Характер адаптации к щелочным условиям определяли по разработанной ранее методике, измеряя ско-

рость линейного роста грибов в трубках со средой с разными значениями pH [5]. Для опытов использовали среды на основе солодового экстракта, различные значения pH сред поддерживали за счет буферных компонентов: 0,2 М цитратного (pH 4,0; 5,2; 5,6), 0,2 М фосфатного (pH 7,0; 8,0) и 0,2 М карбонатно-бикарбонатного (pH 9,2; 10,2; 10,6) буферов. Культуры инкубировали в темноте в термостате при 28°C. Для отдельных изолятов определяли скорость роста при разных концентрациях (от 0 до 2 М) хлорида натрия в среде (ЩА) на чашках Петри.

Результаты

Характеристика образцов почвы и количественная оценка грибов. Отобранные образцы почвы характеризуются околонеутральными значениями pH – от 7,5 до

7,9 (в среднем 7,7±0,1). 7 из 20 исследованных образцов (верхний слой соли, некоторые образцы песка) прибрежных почв озера Баскунчак не содержали грибных зачатков. В 1 г сухой почвы в среднем отмечено около 19 колониеобразующих единиц щелочеустойчивых грибов. На ЩА выделено 17 видов грибов и 15 неидентифицированных стерильных мицелиев (всего 55 изолятов). Встречаемость отдельных видов на ЩА варьировала от 5% до 25%.

Таксономическое разнообразие микромицетов. Морфолого-культуральные и молекулярно-генетические исследования показали, что щелочеустойчивые изоляты относятся к нескольким классам аскомицетов – среди них есть представители из Dothideomycetes (семейства Cladosporiaceae, Pleosporaceae), Eurotiomycetes (Trichocomaceae, Onygenaceae) и Sordariomycetes (Hypocreales, Microascaceae, Plectosphaerellaceae, Chaetomiaceae) (таблица). Стерильные изоляты, скорее всего, также относятся к аскомицетам.

Данные анализа транскрибируемого спейсерного участка рибосомальной ДНК (ITS) показали, что 4 изолята из почв побережья озера Баскун-

чак относятся к облигатно алкалофильному роду *Sodiomyces* (Plectosphaerellaceae, Sordariomycetes). Согласно филогенетическим построениям они находятся в базальной части рода и не образуют обособленной клады внутри (рис. 1). Новые

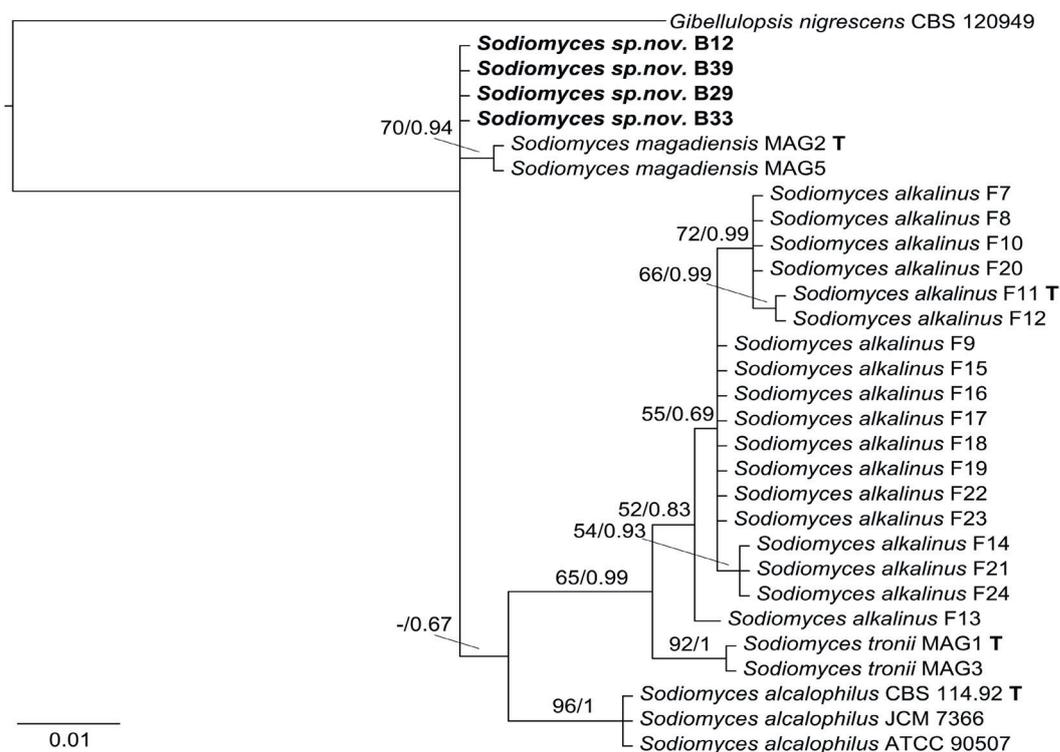


Рис. 1. Филогенетическое положение новых видов внутри рода *Sodiomyces*. Байесовское консенсусное дерево (50% majority rule), основанное на анализе последовательности транскрибируемого спейсерного участка ядерной рибосомальной ДНК. Т – типовые изоляты.

изоляты голоморфные, по морфологии бесполого и полового спороношения хорошо отличаются от известных видов этого рода. Для дальнейшего описания их в качестве нового вида требуются новые филогенетические построения с использованием дополнительных генетических локусов.

Особенности физиологии изолятов. Для отдельных изолятов были проведены ростовые эксперименты в широком диапазоне значений pH (рис. 2), которые показали присутствие в почвах нейтрального засоления алкалофилов – как факультативных (*Emericellopsis* sp., *Sarocladium kiliense*), так и облигатных (*Sodiomyces* sp. nov.). В почве отмечены и алкалотолеранты – сильные (*Acremonium sclerotigenum*), умеренные (*Aspergillus* sect. *Flavipedes*, *Microascus alveolaris*) и слабые (*Alternaria chlamydospora*).

Для *Sodiomyces* sp. nov. и *Emericellopsis* sp. была изучена зависимость скорости роста от концентрации NaCl в среде. Исследованные изоляты устойчивы к повышенным концентрациям хлористого натрия в среде (рис. 3), что позволяет отнести их к галотолерантам. Облигатный алкалофил *Sodiomyces* sp. nov. предпочитает расти на среде

Таблица

Видовой состав и встречаемость микромицетов, изолированных на щелочной агар из засоленных почв побережья озера Баскунчак

Таксономическая принадлежность гриба	Встречаемость, %
ASCOMYCOTA Dothideomycetes Capnodiales, Cladosporiaceae	
<i>Cladosporium</i> sp.	5
Pleosporales, Pleosporaceae	
<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternata</i>	30
<i>Alternaria chlamydospora</i> Mouch.	20
<i>Alternaria</i> sp.	5
<i>Pleosporales</i> sp.	5
Eurotiomycetes Eurotiales, Trichocomaceae	
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> G.A. Huber	15
<i>Aspergillus</i> sect. <i>Flavipedes</i>	5
Onygenales, Onygenaceae	
<i>Chrysosporium lobatum</i> Scharapov	5
Sordariomycetes Hypocreales, Incertae sedis	
<i>Acremonium</i> sp.	10
<i>Acremonium sclerotigenum</i> (Moreau & R. Moreau ex Valenta) W. Gams	5
<i>Emericellopsis</i> sp.	40
<i>Sarocladium kiliense</i> (Grütz) Summerb.	15
Hypocreales, Nectriaceae	
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.	40
Microascales, Microascaceae	
<i>Microascus alveolaris</i> Sand.-Den., Gené & Guarro	10
Glomerellales, Plectosphaerellaceae	
<i>Chordomyces antarcticus</i> Bilanenko, Georgieva & Grum-Grzhim.	15
<i>Sodiomyces</i> sp.nov.	25
Chaetomiaceae, Sordariales	
<i>Chaetomium murorum</i> Corda	15
INSERTAE SEDIS	
<i>Mycelia sterilia</i>	60

без добавления NaCl, но сохраняет рост (хотя и очень слабый) в присутствии 2 М NaCl. Факультативный алкалофил *Emericellopsis* sp. лучше растет при концентрации NaCl в среде 0,4 М и не так значительно снижает скорость роста при концентрации хлорида натрия в среде 2 М.

Обсуждение

Число пропагул щелочеустойчивых грибов в почвах нейтрального засоления на побережье озера невелико (19 колониеобразующих единиц на грамм сухой почвы) и сравнимо с таковым в экстремально щелочных местообитаниях. Среди идентифицированных изолятов большинство принадлежит Sordariomycetes (Plectosphaerellaceae, Microascaceae, Chaetomiaceae, Hypocreales), от-

дельные представители — из Cladosporiaceae, Pleosporaceae, Trichocomaceae, Onygenaceae. Такое таксономическое распределение, в особенности обилие представителей Sordariomycetes, характерно для щелочеустойчивого звена ранее изученных сообществ содовых озер и солончаков, кислых дерново-подзолистых и нейтральных окультуренных почв [5–7].

Анализ скорости роста изолятов в широком диапазоне pH подтвердил наличие в нейтральных гиперсоленых почвах грибов с разными типами адаптации к pH, в том числе и алкалофилов — как факультативных (*Emericellopsis* sp.), так и облигатных (*Sodiomyces* sp. nov.).

Обнаружение облигатных алкалофилов в условиях нейтрального засоления стало неожидан-

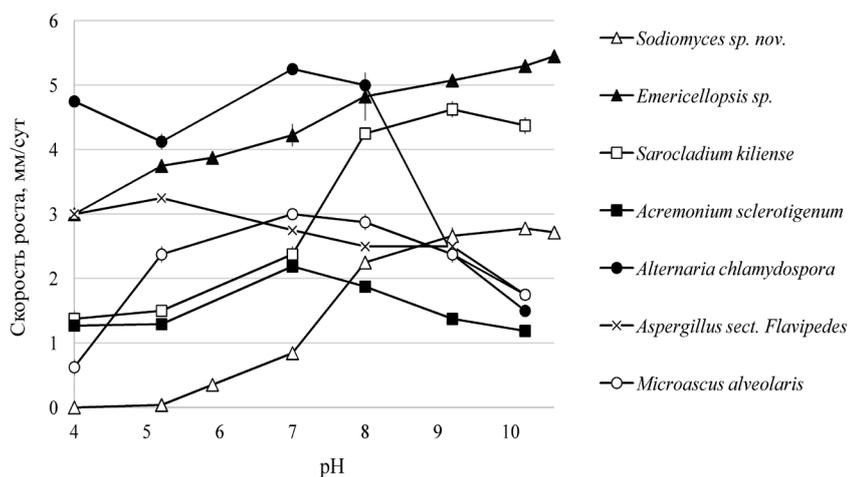


Рис. 2. Зависимость скорости линейного роста изолятов, выделенных на щелочной агар из засоленной почвы побережья озера Баскунчак, от pH среды.

ностью, поскольку явление облигатной алкалофилии крайне редко для грибов. Ранее род *Sodiomyces* было предложено считать индикатором стабильного содового засоления [3, 5]. Сравнительно высокая встречаемость (25%) *Sodiomyces sp. nov.* отвергает случайность обнаружения. По физиологическим особенностям (зависимость роста от pH, NaCl) *Sodiomyces sp. nov.* из озера Баскунчак не отличается от других видов рода. Мы предполагаем, что представители рода *Sodiomyces* обладают схожей субстратной приуроченностью. Ранее было показано, что в геноме у типового вида *Sodiomyces alkalinus* гораздо меньше генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в деградации растительной клеточной стенки, чем у его фитопатогенных родственников. В щелочных условиях гриб обладает очень высокой протеолитической активностью. В геноме *Sodiomyces* присутствуют гены, полученные грибом в результате горизонтального переноса и участвующие в метаболизме аминокислот и белков, а также бактериальной клеточной стенки [15]. Все данные указывают на то, что *S. alkalinus* предпочитает высокобелковые субстраты, которые в содовых озерах представлены прокариотами и ракообразными [3, 18].

В нашем случае гриб был выделен из образцов, отобранных в непосредственной близости от уреза воды, где отсутствовали какие-либо растения или их видимые корни. Мы предполагаем, что

Sodiomyces sp. nov. может быть связан с цианобактериальными пленками и матами, которые развиваются на побережье озера [9]. Локальное защелачивание в сообществах цианобактерий, которое возникает в процессе фотосинтеза [16], могло бы объяснить присутствие облигатно алкалофильного гриба в почвах нейтрального засоления.

Другой интересный гриб, выделенный из почв побережья озера Баскунчак – факультативный алкалофил *Emericellopsis sp.* Его приуроченность к засоленным условиям подтверждается физиологическими характеристиками – изоляты имеют оптимум роста при 0,4 М NaCl в среде и выдерживают большие, в сравнении с другими из-

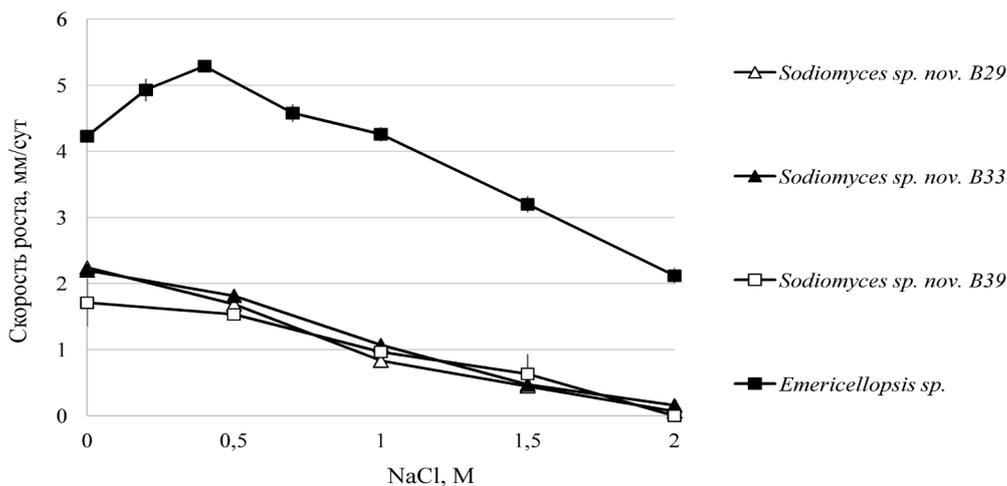


Рис. 3. Зависимость скорости линейного роста алкалофильных изолятов от концентрации NaCl в среде.

ученными нами алкалофилами, концентрации хлорида натрия. В литературе имеются указания на возможную деструкцию грибами *Emericellopsis* поверхностных слоев цианобактериальных матов [17], которые активно развиваются, в том числе, и в озере Баскунчак. Грибы этого рода представляют большой интерес как продуценты новых антибиотиков, в частности, с выраженной антимикотической активностью [18].

Изоляты, имеющие алкалотолерантный тип адаптации к pH, относятся к видам, которые широко распространены и занимают различные экологические ниши. В основном это сапротрофы и патогены растений, такие как *Aspergillus*, *Alternaria*, *Chaetomium* [19, 20]; *Sarocladium kiliense* известен как эндофит, но может быть и возбудителем микозов человека [21]. Многие виды отмечены в засоленных местообитаниях не впервые [5, 13, 14]. Виды родов *Aspergillus* и *Acremonium* были выделены из сообществ цианобактерий искусственно

созданного гиперсоленого озера Мраморное, расположенного рядом с озером Баскунчак, но чуть менее соленого [9].

Таким образом, впервые нам удалось выделить и охарактеризовать щелочеустойчивое звено микобиоты в условиях нейтрального засоления на примере побережья хлоридного озера Баскунчак. Были выделены аскомицеты с разными типами адаптации к щелочным условиям – алкалотолеранты и алкалофилы. Показано, что алкалофилы являются галотолерантами, т.е. устойчивы к повышенным концентрациям хлористого натрия. На побережье озера обнаружен новый вид облигатно алкалофильного рода *Sodiomyces*, что значительно расширяет представления об этой редкой

группе грибов. Дальнейшие исследования экологической роли и ассоциативных связей облигатно алкалофильных грибов могут послужить ключом к пониманию функционирования и эволюции сообществ гиперсоленых местообитаний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00779 мол_а).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bilanenko E.N., Sorokin D.Y., Ivanova M.L., Kozlova M.V. *Heleococcum alkalinum*, a new alkalitolerant ascomycete from saline soda soils // Mycotaxon. 2005. Vol. 91. N 1. P. 497–507.
2. Georgieva M.L., Lebedeva M.P., Bilanenko E.N. Mycelial fungi in saline soils of the western Transbaikalian region // Eurasian Soil Sci. 2012. Vol. 45. N 12. P. 1159–1168.
3. Grum-Grzhimaylo A.A., Debets A.J.M., van Diepeningen A.D., Georgieva M.L., Bilanenko E.N. *Sodiomyces alkalinus*, a new alkaliphilic ascomycete within the Plectosphaerellaceae // Persoonia. 2013. Vol. 31. P. 147–158.
4. Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Debets A.J.M., Bilanenko E.N. Are alkalitolerant fungi of the Emericellopsis lineage (Bionectriaceae) of marine origin // IMA fungus. 2013. Vol. 4. N 2. P. 213–228.
5. Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Bondarenko S.A., Debets A.J.M., Bilanenko E.N. On the diversity of fungi from soda soils // Fungal Divers. 2016. Vol. 76. N 1. P. 27–74.
6. Bondarenko S.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N. Fungi inhabiting the coastal zone of Lake Magadi // Contemp. Probl. Ecol. 2018. Vol. 11. N 5. P. 439–448.
7. Bondarenko S.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N. Alkalitolerant micromycetes in acidic and neutral soils of the temperate zone // Microbiology. 2016. Vol. 85. N 6. P. 737–744.
8. Зеленковский П.С., Куриленко В.В. Природно-техногенная система соляного озера Баскунчак и особенности эксплуатации её ресурсов // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 7. Геол. Геогр. 2013. № 4. С. 33–52.
9. Bataeva Y.V., Dzerzhinskaya I.S., Astafyeva O.V., Satkalieva M.C., Yakovleva L.V., Kondratenko E.I., Magzanova D.K., Baimuhambetova A.S. Investigation of specific microorganisms in the salt lakes of Southern Russia // Afr. J. Microbiol. Res. 2015. Vol. 38. N 9. P. 2051–2056.
10. Buchalo A.S., Nevo E., Wasser S.P., Oren A., Molitoris H.P. Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records // Proc. Biol. Sci. 1998. Vol. 265. N 1404. P. 1461–1465.
11. Kis-Papo T., Oren A., Wasser S.P., Nevo E. Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water // Microbial Ecol. 2003. Vol. 45. N 2. P. 183–190.
12. Smolyanyuk E.V., Bilanenko E.N. Communities of halotolerant micromycetes from the areas of natural salinity // Microbiology. 2011. Vol. 80. N 6. P. 877–883.
13. Oren A., Gunde-Cimerman N. Fungal life in the Dead Sea // Biology of Marine Fungi / Eds. C. Raghukumar. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. P. 115–132.
14. Grishkan I., Nevo E., Wasser S.P. Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel // Mycol. Prog. 2003. Vol. 2. N 1. P. 19–28.
15. Grum-Grzhimaylo A.A., Falkoski D.L., van den Heuvel J., et al. The obligate alkalophilic soda-lake fungus *Sodiomyces alkalinus* has shifted to a protein diet // Mol. Ecol. 2018. Vol. 27. N 23. P. 4808–4819.
16. Kevbrin V.V. Isolation and cultivation of alkaliphiles // Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology / Eds. T. Scheper. Berlin, Heidelberg: Springer, 2019. P. 1–32.
17. Carreira C., Staal M., Falkoski D., Vries R.P., Middelboe M., Brussaard C.P. Disruption of photoautotrophic intertidal mats by filamentous fungi // Environ. Microbiol. 2015. Vol. 17. N 8. P. 2910–2921.
18. Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Baranova A.A., Vasilchenko A.S., Lushpa V.A., Mineev K.S., Georgieva M.L., Kul'ko A.B., Krashennnikov M.E., Lyundup A.V., Vasilchenko A.V., Andreev Y.A. A novel lipopeptaibol emericellipsin A with antimicrobial and

antitumor activity produced by the extremophilic fungus *Emericellopsis alkalina* // *Molecules*. 2018. Vol. 23. N 11. E2785.

19. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi. Second edition. Eching: IHW-Verlag & Verlagsbuchhadlung, 2007. 700 pp.

20. Zare R., Gams W.D., Starink-Willemsse M., Summerbell R.C. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Muscellium*, a new genus for *V. theobromae* // *Nova Hedwigia*. 2007. Vol. 85.

N 3–4. P. 463–489.

21. Giraldo A., Genù J., Sutton D.A., Madrid H., De Hoog G.S., Cano J., Decock C., Crous P.W., Guarro J. Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales) // *Persoonia*. 2015. Vol. 34. P. 10–24.

Поступила в редакцию 22.03.2019 г.

После доработки 24.04.2019 г.

Принята в печать 06.05.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

FIRST DISCOVERY OF ALKALI-RESISTANT FUNGI ON THE COAST OF CHLORIDE LAKE BASKUNCHAK

S.A. Bondarenko^{1,2,*}, M.L. Georgieva^{1,3}, L.Y. Kokaeva¹, E.N. Bilanenko¹

¹*Department of Mycology and Algology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33–2, Moscow, 119071 Russia;*

³*Gause Institute of New Antibiotics, Bolshaya Pirogovskaya 11–1, Moscow, 119021 Russia*

*e-mail: bond.sonia@gmail.com

This is the first study of alkali-resistant fungi in the conditions of neutral salinization at the Lake Baskunchak (Astrakhan region, Russia). Fungi were isolated from the lake coast chloride soils on alkaline agar medium (pH 10.0–10.5); isolates were characterized by morphological, cultural, and molecular genetic features; phylogenetic analysis and analysis of adaptation to pH and salinity were performed. It has been shown that alkali-resistant fungi at the lake coast is a polyphyletic group of Ascomycetes from Sordariomycetes (9 species), Dothideomycetes (5 species), Eurotiomycetes (3 species), and also sterile mycelium (15 isolates). The study of the growth rates in a wide range of pH has shown that among the isolates there are both alkalotolerant fungi and alkaliphilic one. The tolerance of isolates to elevated concentrations of sodium chloride was confirmed. The discovery of obligate alkaliphiles, under conditions of neutral salinization, was unexpected. Phylogenetic reconstructions were carried out, obligate alkaliphilic isolates were characterized as a new species of the genus *Sodiomyces*. In the article, we discuss the possible ecological role of alkali-resistant fungi in saline habitats.

Keywords: *extremophiles, alkaliphilic fungi, alkalotolerant fungi, Sodiomyces, salt lakes, Lake Baskunchak, halotolerant fungi*

Сведения об авторах

Бондаренко София Андреевна – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: bond.sonia@gmail.com

Кокаева Людмила Юрьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: kokaeval@gmail.com

Георгиева Марина Леонидовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: i-marina@yandex.ru

Биланенко Елена Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: e_bilanenko@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК582.26:57.044

ОЧИСТКА КУЛЬТУР ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ, КОНТАМИНИРОВАННЫХ КИНЕТОПЛАСТИДОЙ *BODO SALTANS* EHRENBERG, 1832

Н.А. Давидович^{1,2,*}, О.И. Давидович¹, Ю.А. Подунай¹, С.Л. Полякова¹, Р. Гастиньо²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Карадагская научная станция имени Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН», Россия, 298188, г. Феодосия, п. Курортное, ул. Науки, д. 24;

²Natural Sciences Research and Educational Center and Palaeoceanology Unit, Faculty of Geosciences, University of Szczecin, Mickiewicza 16a, Szczecin, 70-383, Poland
*e-mail: karadag-algae@yandex.ru

Культивирование диатомовых водорослей сопряжено со многими проблемами, одна из которых касается контаминации культур различными микроорганизмами. Среди контаминантов нередко встречается представитель кинетопластид, свободноживущий бактериотроф *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832. В случае, когда *B. saltans* достигает большой численности, клетки диатомовых в культуре перестают делиться, часть из них погибает, становясь субстратом для развития бактерий, и вслед за этим представителей следующего трофического звена – кинетопластид. Для очистки культур диатомовых мы применили амфотерицин В – полиеновый макроциклический антибиотик, активный в отношении некоторых простейших и грибов. Проверено действие вещества на *B. saltans* в культурах восьми видов диатомовых, включая *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Cox, *Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer, *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget, *Pleurosigma aestuarii* (Brébisson ex Kützing) W. Smith, *Pleurosigma* sp., *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle и *P. pungens* (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle. Экспериментально определена зависимость темпов деления клеток диатомовых, подвергнувшихся воздействию амфотерицина В, от дозы и продолжительности воздействия. Даны рекомендации по использованию амфотерицина В для очистки культур диатомовых от *B. saltans*.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, культивирование, кинетопластиды, контаминант, *Bodo saltans*, амфотерицин В

Культивирование диатомовых водорослей – далеко не тривиальная задача. Приходится учитывать ряд обстоятельств. Прежде всего, надо отметить сравнительно короткую продолжительность их жизненного цикла, которая составляет, в зависимости от вида и условий роста, от нескольких месяцев до нескольких лет [1]. Жизненный цикл у многих видов состоит из двух фаз – до-репродуктивной и репродуктивной, у некоторых может наблюдаться еще и пострепродуктивная фаза. Переход из одной фазы в другую обусловлен достижением клетками определенных размеров, которые постоянно уменьшаются в результате повторяющихся митотических делений [1, 2]. При достижении критической границы – верхней границы диапазона размеров, допускающих половое воспроизведение – клетки становятся сексуально индуцибельными [3], т.е. способными, при наличии благоприятных условий, приступить к поло-

вому воспроизведению, в результате которого появляются быстро растущие зиготы (ауксоспоры), внутри них формируются инициальные клетки, имеющие наибольшие, характерные для вида размеры. Таким образом, уменьшение размеров клеток в жизненном цикле приводит к неизбежному исчезновению клонов (генетических линий). В процессе полового воспроизведения и ауксоспрообразования исходные размеры клеток в популяции восстанавливаются, но при этом каждый клон потомства будет иметь новую генетическую композицию.

В случае с диатомовыми проблема усугубляется еще тем, что, ввиду их высокой требовательности к условиям содержания, потеря клона может произойти до того, как в процессе полового воспроизведения будут получены клетки новой генерации. Диатомовые весьма чувствительны к составу среды и к продуктам собственного метабо-

лизма. Вследствие автоингибирования и истощения необходимых элементов их рост замедляется, культуры быстро достигают стационарной фазы. Пересевы в свежую среду приходится делать чаще по сравнению с другими одноклеточными водорослями. На практике для поддержания экспоненциальной фазы роста при обычных условиях культивирования пересевы приходится осуществлять каждые 7–10 сут. Поскольку в большинстве коллекций содержатся неаксеничные культуры, задержка с пересевами приводит к тому, что при переходе в стационарную фазу роста, когда клетки диатомовых перестают делиться, а часть из них погибает, в среде интенсивно развиваются бактерии и простейшие.

Разнообразие контаминантов очень велико. Нередко в культурах диатомовых встречается представитель кинетопластид, свободноживущий бактериотроф *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832 (рис. 1). Присутствие *B. saltans* в культурах диатомовых водорослей может привести к их гибели. В случае, когда *B. saltans* достигает большой численности, клетки диатомовых перестают делиться, часть из них погибает, становясь субстратом для развития бактерий и, вслед за этим, представителей следующего трофического звена — кинетопластид. Очистка культур от сопутствующих микроорганизмов представляет собой актуальную задачу.

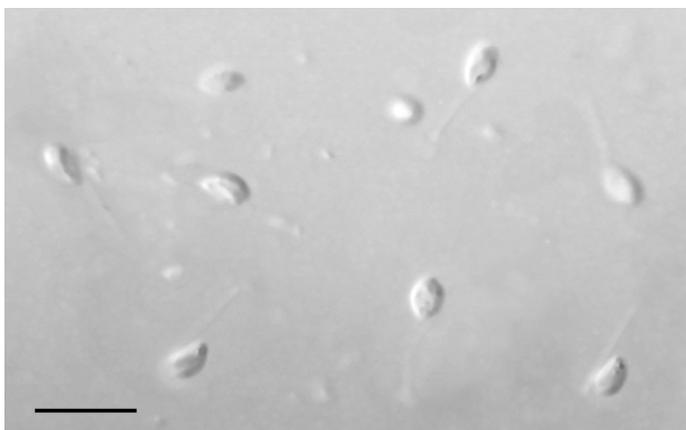


Рис. 1. Кинетопластида *Bodo saltans* Ehrenberg, встречающаяся в неаксеничных культурах диатомовых водорослей. Масштаб 10 мкм.

Мы выполнили серию экспериментов, в которых в качестве основного вещества, активного в отношении кинетопластид, было использовано такое вещество как амфотерицин В. Ставилась задача выяснить устойчивость к нему диатомей, оценив не только темп вегетативного деления клеток, но и сохранение способности к оставлению нового поколения потомства. В статье представлены результаты экспериментов и даны рекомендации по использованию препарата для очистки культур диатомовых от такого контаминанта, как

B. saltans.

Материалы и методы

Для экспериментов были использованы клоновые культуры восьми видов диатомовых водорослей: *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow; *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Cox; *Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer; *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget; *Pleurosigma aestuarii* (Brébisson ex Kützing) W. Smith; *Pleurosigma* sp.; *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle; *P. pungens* (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle. *A. crystallina* относится к полярным центрическим, а остальные — к шовным пеннатным. За исключением планктонных *Pseudo-nitzschia*, все указанные водоросли ведут субстратно-связанный образ жизни, встречаются на поверхности твердых предметов и макрофитов. Пробы, из которых была выделена *Pleurosigma* sp., доставлены из Онежской губы Белого моря. Клоны остальных видов были выделены из бентосных и планктонных проб, отобранных в акватории Карадагского заповедника, бухт г. Севастополя и озера Донузлав (Крымский полуостров). Культуры содержали в модифицированной нами [4] среде ESAW [5]. Ряд клонов оказался контаминирован кинетопластидой *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832. Видовую принадлежность выделенного из наших проб *B. saltans* подтвердили данные генетического анализа [6]. Можно отметить также, что идентичными оказались генетические последовательности 18s рибосомальной РНК штамма, изолированного нами из бухты Казачья (Севастополь, Крым), и штамма, изолированного в районе г. Геленджика на Кавказском побережье [7].

Действующее вещество амфотерицин В (полиеновый макроциклический антибиотик с противогрибковой активностью, продуцируемый *Streptomyces nodosus*), представленный в виде сухого лиофилизированного порошка, растворяли в дистиллированной воде. Концентрация базового раствора амфотерицина В составляла 1 г/л. Из базового раствора в соответствии со схемой эксперимента брали необходимое количество для добавления в чашки Петри с клоновыми культурами водорослей, зараженными *B. saltans*. Эксперименты выполняли в двух вариантах: 1) при одной и той же экспозиции в чашки добавляли разное количество амфотерицина В; 2) одно и то же количество вещества добавляли во все чашки, различалась экспозиция. По окончании экспозиции клетки отмывали от амфотерицина В. Для этого бентосные (прикрепленные ко дну чашки Петри) и планктонные формы после осаждения центрифугированием дважды промывали свежей средой, удалив старую. Залив свежую среду в третий раз, культуры оставляли в чашках для последующего изучения эффекта воздействия, который опреде-

ляли по наличию/отсутствию живых (подвижных) клеток *B. saltans*, соотношению живых и мертвых (с разрушенными хлоропластами) клеток диатомовых, темпу деления сохранившихся клеток диатомовых. Для определения темпа деления в первый день (после отмывки) и в последующие 4–5 сут подсчитывали количество клеток в 15 полях зрения микроскопа при одном и том же увеличении. Темп деления (r) рассчитывали, используя уравнение экспоненциального роста численности

$$N_t = N_0 \cdot \exp(r \cdot t), \quad (1)$$

где N_t и N_0 — число клеток соответственно в момент времени t и начальный момент времени t_0 . После преобразования получаем линейное уравнение

$$\ln(N_t / N_0) = r \cdot t, \quad (2)$$

которое можно использовать для расчета по методу наименьших квадратов значений зависимого коэффициента r (размерность сут⁻¹) на основании эмпирически полученных точек. Для того чтобы перейти к размерности делений · сут⁻¹, полученные значения коэффициента r надо поделить на $\ln(2)$ [8]. Ошибку коэффициента r в уравнении линейного вида определяли согласно рекомендациям, изложенным в пособии по биометрии [9]. На графиках представлены средние значения и стандартные ошибки среднего.

Действие амфотерицина В на репродуктивную функцию диатомей проверяли в экспериментах по скрещиванию контрольных пар клонов *Entomoneis paludosa* (клоны 7.0525-А и 7.0525-В) и *Ardissonea crystallina* (8.0125-А и 8.0125-Д), у которых ранее отмечалось аукоспоробразование.

Результаты

Добавление амфотерицина В в среду, вплоть до концентрации 200 мг · л⁻¹, не приводило к мгновенной гибели клеток *B. saltans*, однако при прямом визуальном наблюдении воздействие на кинетопластид было заметно уже через несколько минут после добавления препарата. Изменялся характер движения, оно становилось импульсивным. Затем терялся контакт жгутика с субстратом, клетки поднимались в толщу воды. Через несколько минут клетки округлялись и замирали, паря в толще воды. Так как клетки *B. saltans* находились во взвешенном состоянии, промывка культур средой с амфотерицином В позволила относительно легко очистить от них большинство контаминированных клонов бентосных диатомовых, клетки которых прикреплены к субстрату. Сложнее было очистить культуры *Pseudo-nitzschia*, клетки которых парят в толще воды. Следует заметить, что действие амфотерицина В было летальным не для всех клеток *B. saltans*, после одной-двух промывок часть клеток, оставшихся в культуре, продолжала развиваться. Поэтому для достижения гаранти-

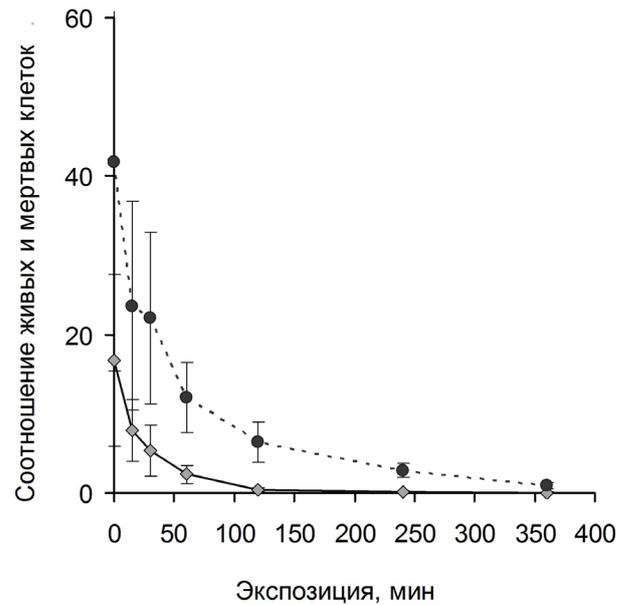


Рис. 2. Соотношение количества живых и мертвых клеток в культуре *Pleurosigma* sp. на вторые (сплошная линия) и четвертые сутки (пунктирная линия) в зависимости от продолжительности воздействия амфотерицином В в концентрации 100 мг · л⁻¹.

рованных результатов очистки выполнялось субклонирование диатомей — из имеющегося клона, после его неоднократной (5–7 раз) промывки амфотерицином В, выделяли и помещали в свежую среду одну или несколько клеток.

Несомненно, антибиотики и фунгициды действуют не только на *B. saltans*, но и на клетки самих диатомовых. Сразу после воздействия препаратом часть клеток диатомовых погибала, однако некоторая часть оставалась в живых и продолжала делиться. Соотношение живых и мертвых клеток диатомовых в культуре после воздействия препаратом зависело как от времени воздействия (рис. 2), так и от дозы препарата (рис. 3). Выжившие клетки диатомей продолжали делиться, поэтому через несколько суток после отмывки от амфотерицина В соотношение живых и мертвых клеток в культурах возрастало, особенно это было заметно у *Haslea karadagensis* и *Pleurosigma* sp. (см. рис. 3А, Б). Представление о физиологическом состоянии клеток после воздействия препаратом в разной концентрации и с разной экспозицией дает такая интегральная характеристика, как темп деления. После обработки амфотерицином В темп деления оставшихся в живых и помещенных в свежую среду клеток *Entomoneis paludosa*, *Haslea karadagensis* и *Pleurosigma* sp. практически остался таким же, как у тех клеток, которые не подвергались воздействию (рис. 4). В то же время, *Ardissonea crystallina* оказалась более чувствительной к амфотерицину В, клетки прекращали делиться и отмирали после одночасового воздействия препаратом в концентрации 50 мг · л⁻¹ и выше. Выжившие клетки

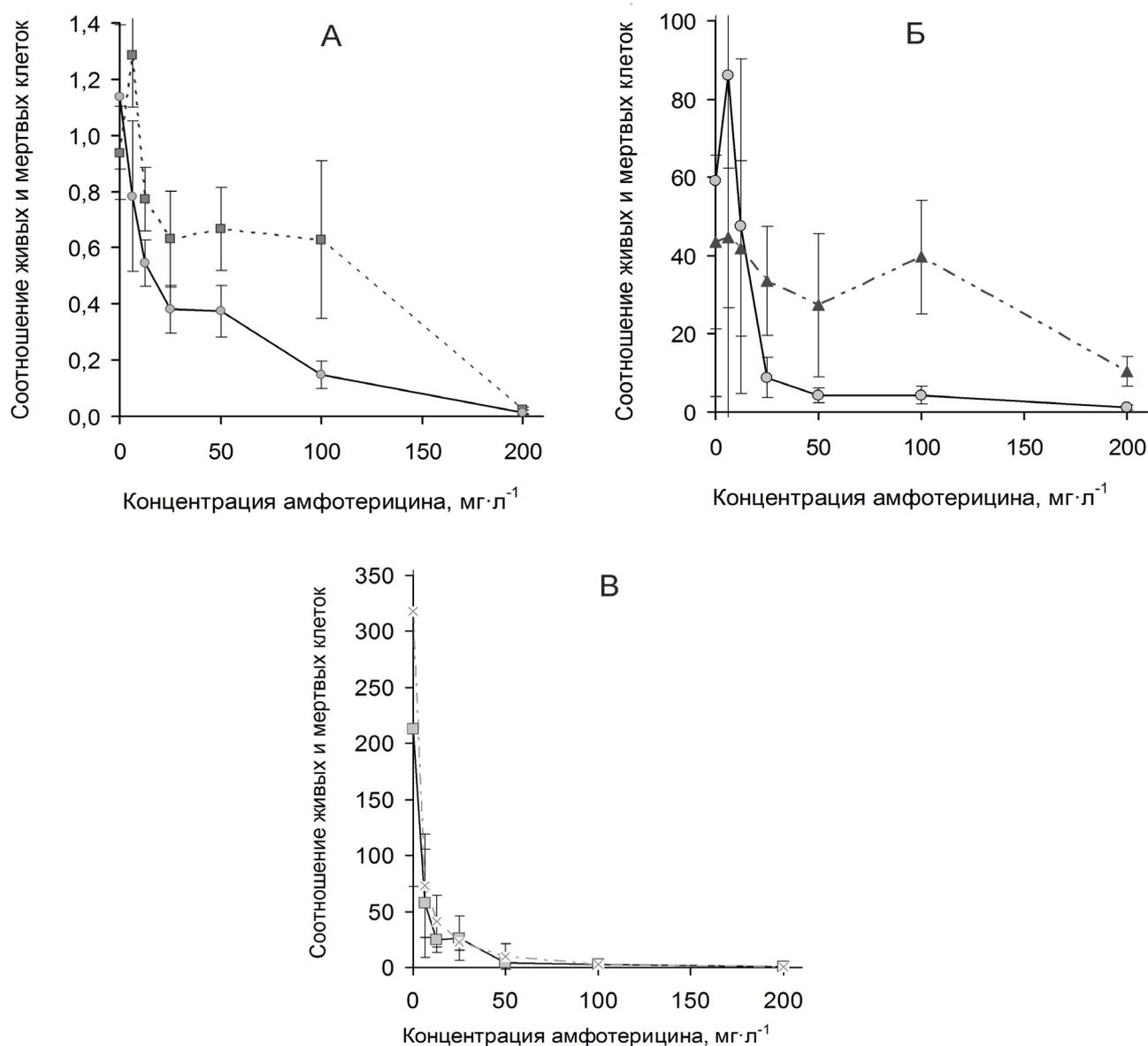


Рис. 3. Соотношение количества живых и мертвых клеток в культурах *Haslea karadagensis* (А), *Pleurosigma* sp. (Б) и *Entomoneis paludosa* (В) через одни сутки (сплошная линия) и четверо суток (пунктирная линия) после обработки амфотерицином В в течение одного часа в зависимости от его концентрации.

Entomoneis paludosa, *Haslea* и *Pleurosigma* оставались подвижными. Цвет, размер и форма хроматофоров у них не изменились, хотя в первые часы после воздействия препарата у части клеток хроматофоры сжимались и обесцвечивались. Наибольшую чувствительность к амфотерицину В продемонстрировали хлоропласты *Climaconeis scalaris*. Препарат в концентрации $50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ вызывал изменение формы и разрушение хлоропластов у подавляющего большинства клеток *C. scalaris* в течение нескольких минут.

На примере *E. paludosa* и *A. crystallina* проверили способность водорослей к половому воспроизведению после воздействия амфотерицином В ($100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в течение 60 мин и $50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ в течение 30 мин соответственно). В контрольных парах клонов гаметогенез, аукоспоробразование,

формирование инициальных клеток прошли в соответствии с обычной схемой; ни в сроках, ни в процессах отклонений замечено не было.

Обсуждение

Попытки очистить культуры одноклеточных водорослей от посторонних организмов, используя химические препараты и природные биологически активные вещества, предпринимались неоднократно, разработаны специальные процедуры и протоколы [10, 11]. Применяя антибиотики и фунгициды можно очистить культуры водорослей соответственно от бактерий либо микромицетов, а комбинируя препараты, — от тех и других в совокупности. В то же время, можно отметить, что сопутствующая микрофлора в культурах микроводорослей, как правило, не ограничена только

бактериями и грибами. Присутствие бактерий служит хорошим пищевым базисом для следующего трофического звена, в котором свободноживущие кинетопластиды играют заметную роль [12].

Bodo saltans распространен повсеместно, обитает в морской и пресной воде, в почве, в болотах, в пещерных водоемах [7, 13, 14], и ряд авторов считает его космополитом [12], хотя последние молекулярные данные показывают значительную генетическую дифференциацию штаммов из разных местообитаний [15]. Клетки *B. saltans* длиной порядка 4–5 мкм, некоторые авторы указывают бóльшие значения, вплоть до 10–15 мкм [13]. Клетки имеют два жгутика, одним из них прикрепляются к субстрату, из-за чего избавиться от этого контаминанта простой промывкой практически невозможно. Прикрепленные к субстрату клетки *B. saltans* осуществляют характерные подергивания и скачки. Питаясь бактериями, *B. saltans* в свою очередь служит пищей для других протистов – например, из рода *Aurigomonas* [16]. Бодониды отличаются высоким темпом деления, в стадии экспоненциального роста культур удвоение численности происходит каждые 3–4 ч [13], что намного превосходит темп деления клеток диатомовых. Известна высокая устойчивость бодонид к токсическим веществам – например, они способны развиваться в массовых количествах в почвах после их обработки различными гербицидами [13].

Повышенный интерес к *B. saltans* не случаен. Его ближайшие родственники, паразитические трипаносоматиды, вызывают значительную смертность людей и домашних животных. В настоящее время активно исследуется геном *B. saltans*. Целью исследований является поиск «внешней группы» для сравнительного геномного анализа. Являясь одним из ближайших родственников трипаносоматид, *B. saltans* может служить моделью для изучения эволюции паразитизма [17]. Дополнительный мотив к изучению *B. saltans* недавно возник в связи с открытием инфицирующего его гигантского вируса из семейства Mimiviridae [18].

Заметим, что до промывки амфотерицином В выполнить субклонирование диатомей было практически невозможно. В микропипетку, с помощью которой осуществляли выделение клеток, непременно попадало большое количество контаминантов. Только благодаря действию препарата оказалось возможным вымыть из культуры

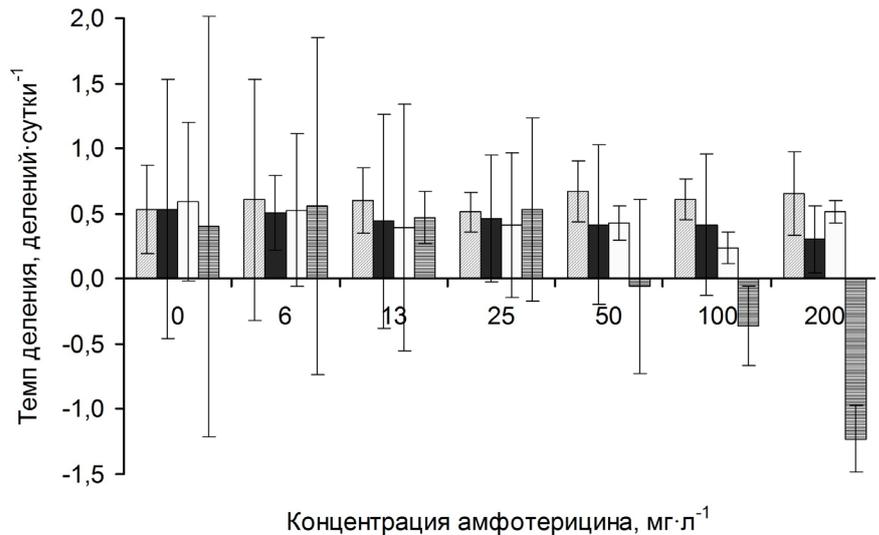


Рис. 4. Темп деления клеток *Haslea karadagensis* (первый столбец слева), *Pleurosigma sp.* (второй столбец), *Entomoneis paludosa* (третий столбец) и *Ardissonaea crystallina* (четвертый столбец) после одночасовой обработки амфотерицином В в разной концентрации (рассчитано по изменению численности за 4–5 сут).

обездвиженные и потерявшие связь с субстратом клетки *B. saltans*, значительно понизив их титр, а вслед за этим выделить субклоны диатомей. Даже если сохранялось всего несколько клеток диатомей, клон мог продолжить существование. В противном случае – без осуществления указанных процедур – клон неизбежно терялся. Несмотря на то, что в первые дни после обработки амфотерицином В темп деления водорослей несколько снижался, в последующие дни он восстанавливался до прежнего уровня, и далее культуры приходилось пересевать с обычной периодичностью. В целом, деконтаминированные культуры выглядели здоровыми, о чем свидетельствовали внешний вид клеток, их подвижность, состояние хлоропластов. Следует указать на то, что не все водоросли одинаково устойчивы к действию амфотерицина В, поэтому подбор дозы препарата и времени экспозиции следует проводить индивидуально в отношении каждого вида.

Примечателен тот факт, что воздействие амфотерицина В не сказывалось на репродуктивной функции диатомовых – по крайней мере, у проверенных в этом отношении *Entomoneis paludosa* и наиболее чувствительной к амфотерицину В из изученных видов *Ardissonaea crystallina*.

После устранения *B. saltans* из культур в тех из них, в которых было много погибших диатомовых, обнаруживалась (до следующих пересевов) повышенная концентрация бактерий, что легко объяснить попаданием в среду органических веществ из разрушенных клеток. Заметим, что в

культурах, контаминированных исключительно бактериями, диатомовые чувствовали себя лучше, чем в тех случаях, когда в них присутствовал также *B. saltans*. Случаев гибели таких культур мы не отмечали.

В заключение отметим, что такой антибиотик, как амфотерицин В может быть использован для очистки культур диатомовых от посторонних организмов и, в частности, от кинетопластид, однако важно помнить, что для обеспечения чистоты культуры, помимо соблюдения всех классических приемов, принятых в микробиологической практике, одним из важнейших требований является содержание водорослей в благоприятных условиях, для чего необходимо осуществлять регулярные и своевременные пересевы. Применительно к диатомовым это означает необходимость

недопущения перехода культур в стационарную фазу роста и, тем более, в фазу деградации, когда в среде в большом количестве развиваются бактерии, а вслед за ними гетеротрофные кинетопластиды.

Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов», № госрегистрации АААА-А19-119012490045-0.

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mann D.G. Size and sex // The diatom world. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology. Vol. 19 / Eds. J. Seckbach and J.P. Kociolek. Dordrecht: Springer, 2011. P. 145–166.
2. Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The Diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1990. 747 pp.
3. Geitler L. Reproduction and life history in diatoms // Botanical Rev. 1935. Vol. 1. N 5. P. 149–161.
4. Полякова С.Л., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Давидович Н.А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // Морской биол. журн. 2018. Т. 3. № 2. С 73–78.
5. Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. Recipes for freshwater and seawater media // Algal culturing techniques / Ed. R.A. Andersen. N.Y.: Elsevier Academic Press, 2005. P. 429–538.
6. Gastineau R., Lemieux C., Turmel M., Davidovich N.A., Davidovich O.I., Mouget J.-L., Witkowski A. Mitogenome sequence of a Black Sea isolate of the kinetoplastid *Bodo saltans* // Mitochondrial DNA Part B. 2018. Vol. 3. N 2. P. 970–971.
7. Scheckenbach F., Wylezich C., Mylnikov A.P., Weitere M., Arndt H. Molecular comparisons of freshwater and marine isolates of the same morphospecies of heterotrophic flagellates // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72. N 10. P. 6638–6643.
8. Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M. Measuring growth rates in microalgal cultures // Algal culturing techniques / Ed. R.A. Andersen. N.Y.: Elsevier Academic Press, 2005. P. 269–286.
9. Glantz S.A. Primer of biostatistics. N.Y.: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1997. 473 pp.
10. Droop S.J.M. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics // Br. Phycol. Bull. 1967. Vol. 3. N 2. P. 295–297.
11. Guillard R.R.L. Purification methods for microalgae // Algal culturing techniques / Ed. R.A. Andersen. N.Y.: Elsevier Academic Press, 2005. P. 117–132.
12. Mitchell G.C., Baker J.H., Sleigh M.A. Feeding of a freshwater flagellate, *Bodo saltans*, on diverse bacteria // J. Eukar. Microbiol. 1988. Vol. 35. N 2. P. 219–222.
13. Жуков Б.Ф. Атлас пресноводных гетеротрофных жгутиконосцев (биология, экология, систематика). Рыбинск: Рыб. Дом печати, 1993. 160 с.
14. Arndt H., Dietrich D., Auer B., Cleven E.-J., Gräfenhan T., Weitere M., Mylnikov A.P. Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems // The flagellates: unity, diversity and evolution. Vol. 59 / Eds. B.S.C. Leadbeater and J.C. Green. London: Taylor and Francis, 2000. P. 240–268.
15. von der Heyden S., Cavalier-Smith T. Culturing and environmental DNA sequencing uncover hidden kinetoplastid biodiversity and a major marine clade within ancestrally freshwater *Neobodo designis* // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. Vol. 55. N 6. P. 2605–2621.
16. Vickerman K., Appleton P. L., Clarke K. J., Moreira D. *Aurigamonas solis* n. gen., n. sp., a soil-dwelling predator with unusual helioflagellate organisation and belonging to a novel clade within the Cercozoa // Protist. 2005. Vol. 156. N 3. P. 335–354.
17. Yazaki E., Ishikawa S.A., Kume K., Kumagai A., Kamaishi T., Tanifuji G., Hashimoto

T., Inagaki Y. Global Kinetoplastea phylogeny inferred from a large-scale multigene alignment including parasitic species for better understanding transitions from a free-living to a parasitic lifestyle // *Genes Genet. Syst.* 2017. Vol. 92. N 1. P. 35–42.

18. Deeg C.M., Chow C.-E.T., Suttle C.A. The kinetoplastid-infecting *Bodo saltans* virus

(BsV), a window into the most abundant giant viruses in the sea // *eLife*. 2018. Vol. 7: e33014.

Поступила в редакцию 31.01.2019 г.

После доработки 05.04.2019 г.

Принята в печать 16.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

TREATING OF DIATOM ALGAE CULTURES CONTAMINATED WITH THE KINETOPLASTID *BODO SALTANS* EHRENBERG, 1832

N.A. Davidovich^{1,2,*}, O.I. Davidovich¹, Yu.A. Podunay¹, S.L. Polyakova¹, R. Gastineau²

¹Federal State Budget Scientific Institution «T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences», Nauki str. 24, Kurortnoye, 298188, Russia;

²Natural Sciences Research and Educational Center and Palaeoceanology Unit, Faculty of Geosciences, University of Szczecin, Mickiewicza 16a, Szczecin, 70-383, Poland

*e-mail: karadag-algae@yandex.ru

Cultivation of diatom algae is associated with many problems, one of them concerns the contamination of cultures with various microorganisms. A representative of kinetoplastids, the free-living bacteriotroph *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832 can be often found among contaminants. In the case when *B. saltans* reaches a large number, diatom cells cease to divide, some of them die, becoming a substrate for the development of bacteria, and for the next trophic link, kinetoplastids. For the decontamination of diatom cultures, we used amphotericin B, a polyene macrocyclic antibiotic active against some protozoa and fungi. The effect of the drug on *B. saltans* in cultures of eight species of diatoms, including *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow, *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Cox, *Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer, *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget, *Pleurosigma aestuarii* (Brébisson ex Kützing) W. Smith, *Pleurosigma* sp., *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle, and *P. pungens* (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle was investigated. The rate of division of diatom cells exposed to amphotericin B, depending on the dose and duration of exposure, was experimentally determined. Recommendations on the use of amphotericin B for the decontamination of diatom cultures from *B. saltans* are given.

Keywords: diatoms, cultivation, kinetoplastidae, contaminant, *Bodo saltans*, amphotericin B

Сведения об авторах

Давидович Николай Александрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты ФГБУН «КНС–ПЗ РАН». Тел.: 8-365-622-62-12; e-mail: karadag-algae@yandex.ru

Давидович Ольга Ивановна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты ФГБУН «КНС–ПЗ РАН». Тел.: 8-365-622-62-12; e-mail: olivdav@mail.ru

Подунай Юлия Александровна – науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты ФГБУН «КНС–ПЗ РАН». Тел.: 8-365-622-62-12; e-mail: grab-ua@yandex.ua

Полякова Светлана Леонидовна – мл. науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты ФГБУН «КНС–ПЗ РАН». Тел.: 8-365-622-62-12; e-mail: svetlana.poliakova.77@mail.ru

Гастиньо Роман (Gastineau Romain) – Ph.D., научный сотрудник (research assistant), Natural Sciences Research and Educational Center and Palaeoceanology Unit, Faculty of Geosciences, University of Szczecin, Szczecin, Poland. Tel.: +48-91-444-1000; e-mail: gastineauromain@yahoo.fr

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 615.015

АНТИПАРКИНСОНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРА ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У МЫШЕЙ

А.П. Калинина*, И.Г. Капица, Е.А. Иванова, Т.А. Воронина

Лаборатория психофармакологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия,
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8
*e-mail: viburnum.fbm@gmail.com

Пролилэндопептидаза участвует в процессах нейродегенерации, пролиферации, нейровоспаления и дифференцировки нейронов. Обнаружена корреляция между развитием нейродегенеративных заболеваний и повышением уровня пролилэндопептидазы в структурах мозга. Показано, что пролилэндопептидаза взаимодействует с прионоподобными белками, которые считаются ключевыми факторами в развитии нейродегенеративных заболеваний. Все вышеперечисленное позволяет считать ингибиторы пролилэндопептидазы перспективной группой веществ для терапии нейродегенеративных заболеваний. В настоящей работе проведено исследование влияния бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидина, нового неконкурентного ингибитора пролилэндопептидазы, в тесте галоперидоловой каталепсии на аутбредных мышцах SHK и на модели паркинсонического синдрома, вызванного однократным системным введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-тетрагидропиридина в дозе 30 мг/кг, у мышей инбредной линии C57Bl/6. Результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют о способности изученного ингибитора пролилэндопептидазы снижать выраженность основных экстрапирамидных симптомов — ригидности и олигокинезии. Однако антикаталептического действия выявлено не было. Полученные данные свидетельствуют о возможном наличии нейропротекторной активности у изученного ингибитора пролилэндопептидазы и об отсутствии его прямого влияния на дофаминергическую систему.

Ключевые слова: пролилэндопептидаза, ингибиторы пролилэндопептидазы, паркинсонический синдром, мышцы, болезнь Паркинсона, нейродегенерация

Пролилэндопептидаза, или пролилэндопептидаза (ЕС 3.4.21.26; ПЭП), входит в небольшую группу высокоспецифичных пептидаз, которые, в отличие от других пептидаз, обладают способностью расщеплять пептидные связи, образованные остатком пролина. Пролинспецифичные ферменты вовлечены в регуляцию различных метаболических процессов, участвуют в дифференциации и созревании клеток, секреции и процессинге белков, катаболических процессах, иммунном ответе.

ПЭП представляет собой высококонсервативную сериновую протеазу, которая расщепляет короткие пептиды (менее 3 кДа) после пролинового остатка. Основными субстратами ПЭП являются гормоны, нейропептиды, адгезионные молекулы и т.д. [1]. ПЭП может влиять на экспрессию генов различных белков [2].

ПЭП экспрессируется повсеместно, наиболее высокая активность фермента обнаружена в

мышцах, семенниках, кортикальном слое почек и подчелюстной железе, клетках эпителия, фибробластах, лимфоцитах и тромбоцитах, сравнительно низкая — в сердце, брыжейке и аорте; относительно высокая активность ПЭП найдена в коре головного мозга, в то время как другие отделы мозга имеют весьма низкую ферментативную активность [3]. Иммуногистохимическим методом выявлено обилие ПЭП в нигростриарной системе, в частности в черной субстанции, хвостатом ядре и бледном шаре [4].

Показана роль ПЭП в процессах нейродегенерации, пролиферации, дифференцировки нейронов, развитии мозга, а также при воспалении [5]. Выявлено драматическое повышение экспрессии ПЭП в астроцитах и микроглии мозга мышей после воспалительного повреждения [6, 7], при этом животные, нокаутированные по гену ПЭП, устойчивы к активации микроглии после введения липополисахарида, вызывающего нейровос-

паление [8].

Повышенный уровень ПЭП отмечается при болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП) и болезни Гентингтона [9–10]. Повышение активности глии при БА и БП также связывают с повышением экспрессии ПЭП [9].

ПЭП задействована в секреции и разрушении белка α -синуклеина [2, 11]. Было установлено, что ПЭП, взаимодействуя с ним, стимулирует агрегационный процесс, а также препятствует элиминации токсичных олигомеров и фибрилл из клеток [12, 13]. При БП внутри нейронов накапливаются тельца Леви, основным компонентом которых и является α -синуклеин [14]. В посмертных образцах мозга пациентов с нейродегенерацией, возникающей при БП и БА, было обнаружено, что неправильно свернутые белки взаимодействуют с ПЭП [9]. Кроме того, повышение концентрации ПЭП было показано на модели паркинсонического синдрома (ПС), вызванного введением ротенона крысам [15]. На модели депрессивного синдрома, индуцированного введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), у крыс выявлено повышение активности ПЭП в структурах мезолимбической и нигростриатной дофаминергических систем [16].

С учетом роли фермента в метаболических процессах, модуляции функционирования различных гормонов и ферментов, участия в воспалительных и нейродегенеративных процессах, а также способности к образованию агрегатов с белками ингибирование ПЭП может оказаться перспективной стратегией в лечении нейродегенеративных заболеваний, в частности БП – заболевания, в развитие которого большой вклад вносят дисфункция митохондрий, нейровоспаление и накопление белка α -синуклеина, приводящие к гибели дофаминергических нейронов [17].

Для оценки возможности использования ингибитора ПЭП в качестве антипаркинсонического средства нами было проведено исследование его активности в тесте галоперидоловой каталепсии и на модели экспериментального ПС, индуцированного однократным введением мышам пронеуротоксина МФТП, вызывающего дефицит дофамина в стриатуме, при последующем проявлении экстрапирамидных нарушений. Целью настоящей работы являлось изучение антипаркинсонической активности ингибитора ПЭП бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидина в эксперименте у мышей.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 30 самцах белых аутбредных мышей SHK массой 27–30 г и на 30 самцах мышей инбредной линии C57Bl/6 массой 25–28 г (питомник-филиал «Столбовая» ФГБУН

«Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»). Животные были рандомизированно распределены по группам (10 животных в каждой). Они содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при 12-часовом световом режиме. Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Организация и проведение работы соответствовали международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказ Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Исследование выполнено согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению лекарственных средств с противопаркинсонической активностью «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, 2012» [18].

Неконкурентный ингибитор ПЭП, бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидин (Z-Met), синтезирован в ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» В.Ф. Поздневым.

Оценку влияния ингибитора ПЭП на дофаминергическую систему проводили с помощью теста галоперидоловой каталепсии на аутбредных мышях SHK. Галоперидол является типичным нейролептиком, вызывающим блокаду дофаминергических рецепторов, и при его применении наблюдается развитие экстрапирамидных нарушений. Z-Met в дозах 5 и 10 мг/кг или физиологический раствор вводили внутривентриально в объеме 10 мл/кг за 10 мин до введения галоперидола (1 мг/кг внутривентриально). Через полчаса после введения галоперидола мышья располагали у горизонтального стержня, закрепленного на высоте 4 см диаметром 0,5 см так, чтобы она опиралась на обе передние лапки («поза лектора»). Попытки придать животному нужную позу продолжали не более 1 мин. Фиксировали время пребывания животного в неподвижном состоянии в неудобной позе. Максимальное время наблюдения составляло 2 мин. Эффективность ингибитора ПЭП Z-Met оценивали по способности уменьшать время каталептогенного состояния животных.

Моделирование ПС вызывали однократным внутрибрюшинным введением нейротоксина МФТП в дозе 30 мг/кг мышам линии C57Bl/6 [19]. Z-Met в дозе 10 мг/кг вводили за 30 мин до введения нейротоксина. Группы контрольных животных (с МФТП и без МФТП) получали внутрибрюшинно физиологический раствор в эквивалентном объеме (10 мл/кг).

Изучение влияния Z-Met на экстрапирамидные нарушения у мышей с ПС, вызванным МФТП, проводили с использованием теста оценки ригидности и тестов, позволяющих оценить олигокинезию: «Открытое поле», «Вращающийся горизонтальный стержень» и «Вертикальный стержень».

Оценку ригидности проводили через 10–12 мин после введения нейротоксина количественно по изменению длины шага у мышей (Stride Length Test). Каждое животное с предварительно окрашенными нетоксичными красками лапами помещали на маркировочную ленту, выстилающую пенал (высота стенок 8 см, ширина 8 см, длина 50 см). Измеряли расстояние (по прямой) между следами лапок в 4–6 шагах животного, вычисляли среднее значение для каждого животного. Шаги в начале и в конце аллеи не учитывали.

Через 90 мин после введения нейротоксина оценивали выраженность олигокинезии по изменению двигательной активности в актометре «Opto Varimex» (Columbus Instruments, США), представляющем собой квадратную арену со стороной 39 см и высотой 20 см с располагающимися по периметру регистрирующими передвижения животных фотоэлементами. Учитывали среднюю величину перемещений за 1 мин в пересчете на одно животное для каждой группы (общее время наблюдения 3 мин).

Тест «Вращающийся стержень» проводили в установке Roda Rod для мышей (Ugo Basile, Италия), которая представляет собой вращающийся барабан (6 см в диаметре), разделенный 6 дисками (25 см в диаметре) на 5 одинаковых частей. Каждое животное помещали в разделенные перегородками компартменты стержня, который вращался с постоянной скоростью 10 об./мин. Фиксировалось латентное время первого падения животного с барабана установки в течение 180 с.

Тест «Вертикальный стержень» (Pole Test) является одним из хорошо воспроизводимых методов для оценки экстрапирамидных нарушений у грызунов с ПС. Установка представляет собой металлический стержень высотой 50 см и диаметром 1 см, обернутый по всей длине бинтом, с пробковым окончанием на вершине диаметром 1,5 см, закрепленным на вершине стержня. Стержень, жестко закрепленный в тяжелом металлическом основании, удерживающем его в вертикальном

положении, располагают в домашней клетке мышей. Животное помещают на верхушку вертикального стержня носом вверх и регистрируют в течение нескольких последовательных подходов латентное время, необходимое животному для ориентирования: поворота в направлении спуска (t-поворота) и спуска в клетку (t-спуска). Максимальное время тестирования составляло 120 с.

Через 24 ч после введения МФТП проводили оценку двигательной активности в установке «Открытое поле» (TS0501-M, «НПК Открытая Наука», РФ), представляющей собой круглую арену диаметром 63 см с бортиком высотой 32 см. Пол арены расчерчен на 19 секторов примерно одинаковой площади, которые располагаются в 3 ряда, и имеет 13 круглых отверстий по 1 см в диаметре. Регистрировали горизонтальную двигательную активность, вертикальную активность у животных, а также число обследованных отверстий в течение 2 мин наблюдения.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета Statistica 10.0. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, равенство дисперсий оценивали с помощью критерия Левена. Критерий Ньюмана-Кейлса применяли при соблюдении двух условий: нормального распределения в группе и равенства дисперсий между группами, данные представляли в виде среднего \pm стандартной ошибки среднего. В обратном случае использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с последующим сравнением критерием Данна, данные представлены как медиана и квартили (25%÷75%). Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В тесте галоперидоловой каталепсии Z-Met не оказал влияния на каталептогенное состояние у мышей SHK. Так, в группе животных, получавших только галоперидол в дозе 1 мг/кг, продолжительность каталепсии в среднем составила $96,17 \pm 11,58$ с, а в группах мышей, которым до введения галоперидола вводили Z-Met в дозе 5 мг/кг и 10 мг/кг — $97,17 \pm 12,31$ и $100,14 \pm 12,43$ с соответственно.

Однократное системное введение МФТП в дозе 30 мг/кг мышам линии C57Bl/6 приводило к появлению выраженной ригидности мышц, что проявлялось уже через 10–12 мин после введения нейротоксина в уменьшении длины шага животных на 40,9% по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). На фоне введения Z-Met в дозе 10 мг/кг отмечалось снижение выраженности ригидности, что выражалось в достоверном увеличении на 20% длины шага мышей по сравнению с группой «МФТП» (рис. 1).

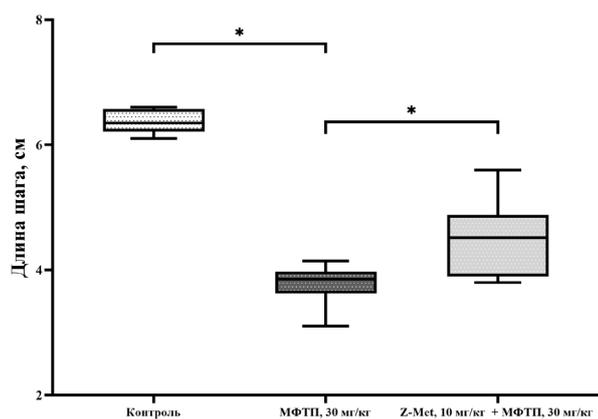


Рис. 1. Влияние ингибитора пролилэндопептидазы (Z-Met) на ригидность мышц у мышей C57BL/6 с паркинсоническим синдромом, вызванным однократным введением пронеуротоксина МФТП (подробности в тексте). * — $p < 0,05$ по сравнению с группой МФТП по критерию Краскела-Уоллиса с последующим сравнением критерием Данна. Границами ящичковой диаграммы служат 1-я и 3-я квартили (25% и 75%), линия в середине обозначает медиану (50%), концы усов — минимальное и максимальное наблюдаемые значения данных в выборке.

Оценку олигокинезии у животных с ПС, индуцированным однократным введением МФТП (30 мг/кг), проводили через 90–120 мин после введения нейротоксина. У животных группы «МФТП» отмечалось снижение двигательной активности в актометре (рис. 2). Количество горизонтальных

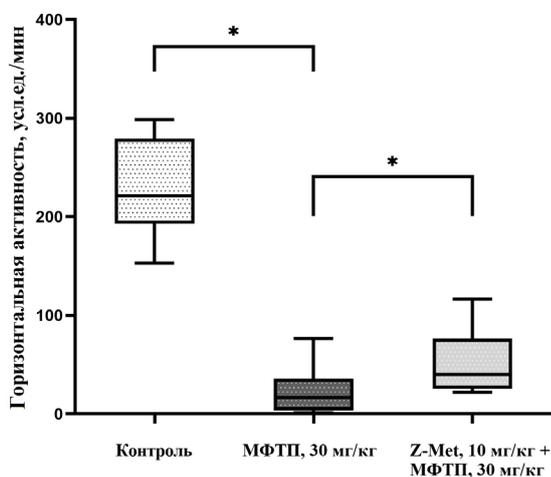


Рис. 2. Влияние ингибитора пролилэндопептидазы (Z-Met) на двигательную активность мышей C57BL/6 с паркинсоническим синдромом, вызванным однократным введением пронеуротоксина МФТП в актометре (подробности в тексте). * — $p < 0,05$ по сравнению с группой МФТП по критерию Краскела-Уоллиса с последующим сравнением критерием Данна. Границами ящичковой диаграммы служат 1-я и 3-я квартили (25% и 75%), линия в середине обозначает медиану (50%), концы усов — минимальное и максимальное наблюдаемые значения данных в выборке.

перемещений на фоне введения МФТП уменьши-

лось в 13,3 раза по сравнению с показателем контрольной группы животных ($p < 0,05$). Введение ингибитора ПЭП Z-Met в дозе 10 мг/кг снизило выраженность олигокинезии, увеличив число горизонтальных перемещений в 2,4 раза относительно группы «МФТП» ($p < 0,05$) (рис. 2).

У животных с ПС, вызванным однократным введением МФТП, через 90–100 мин после инъекции нейротоксина развивался выраженный моторный дефицит, регистрируемый в тесте «Вращающийся стержень» (табл. 1). Так, продолжительность удержания на вращающемся стержне мышей группы «МФТП» была в 11,3 раза меньше показателя контрольной группы ($p < 0,05$). Введение ингибитора ПЭП приводило к уменьшению моторного дефицита у мышей с ПС, что выразилось в увеличении в 6,1 раза продолжительности удержания животных на вращающемся стержне по сравнению с группой, получавшей только нейротоксин, однако не достигавшем статистической значимости (табл. 1).

Оценка поведения мышей с ПС в условиях теста «Вертикальный стержень» показала, что животным с МФТП-индуцированным ПС было значительно труднее осуществить поворот в направлении движения к клетке (сверху вниз): среднее время, необходимое для поворота животных с ПС в сторону клетки, было в 31,0 раз больше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Также мышам с индуцированным МФТП ПС требовалось в 8,5 раза ($p < 0,05$) больше времени для спуска по тонкому вертикальному стержню в клетку, чем животным без патологии (табл. 1). Однократное введение Z-Met в дозе 10 мг/кг за 30 мин до инъекции нейротоксина приводило к уменьшению олигокинезии и выраженности нарушений координации движений в тесте «Вертикальный стержень». На фоне введения препарата наблюдалось уменьшение в 2,6 раза времени, необходимого для осуществления животными поворота в сторону клетки, и сокращение в 1,5 раза продолжительности спуска по сравнению с группой животных с ПС, не получавших препаратов (табл. 1).

Через 24 ч в тесте «Открытое поле» проводили оценку выраженности олигокинезии у мышей с ПС. В группе животных, которым вводили только МФТП, проявления экстрапирамидной симптоматики, характерной для ПС, продолжали наблюдаться. Так, число горизонтальных перемещений в группе «МФТП» было в 1,8 раза меньше по сравнению с показателем контрольной группы (табл. 2). Введение ингибитора ПЭП корректировало проявление олигокинезии, увеличивая горизонтальную активность животных в 1,44 раза по сравнению с группой «МФТП» (табл. 2).

Результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют о способности

Таблица 1

Влияние ингибитора пролилэндопептидазы (Z-Met) на олигокинезию у мышей линии C57BL/6 с паркинсоническим синдромом (медиана, 25%÷75%)

Группа, доза, способ введения	Вращающийся стержень	Вертикальный стержень	
	Время удержания, с	Латентное время переворота, с	Продолжительность спуска, с
Контроль, физиологический раствор	180 (180÷180)*	1,0 (1,0÷1,25)*	7,5 (7,0÷8,75)*
МФТП, 30 мг/кг	16 (12÷55)	29,5 (20,0÷37,0)	63,0 (60,0÷82,5)
Z-Met, 10 мг/кг + МФТП, 30 мг/кг	98 (27÷180)	5,0 (3,0÷20,0)*	60,0 (30,0÷60,0)*

МФТП – нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин;

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой МФТП по критерию Краскела-Уоллиса с последующим сравнением критерием Данна

неконкурентного ингибитора ПЭП Z-Met снижать выраженность экстрапирамидных симптомов, вызванных введением нейротоксина МФТП, обуславливающим специфическое повреждение дофаминергических нейронов у мышей инбред-

тивных процессах [5, 9].

Таким образом, результаты проведенной экспериментальной работы свидетельствуют о перспективе ингибирования ПЭП как стратегии нейропротекторной терапии при нейродегенера-

Таблица 2

Влияние ингибитора пролилэндопептидазы (Z-Met) на двигательную активность мышей линии C57BL/6 с паркинсоническим синдромом в тесте «Открытое поле», (среднее + стандартная ошибка среднего)

Группа, доза, способ введения	Горизонтальная активность, усл.ед.	Вертикальная активность, усл.ед.
Контроль, физиологический раствор	54,86 ± 4,91*	5,29 ± 0,75
МФТП, 30 мг/кг	30,75 ± 2,54	2,88 ± 0,72
Z-Met, 10 мг/кг + МФТП, 30 мг/кг	44,33±4,07*	4,22±0,98

МФТП – нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин;

* – $p < 0,05$ достоверность отличий относительно группы МФТП по критерию Ньюмана-Кейлса

ной линии C57Bl/6.

Отсутствие влияния ингибитора ПЭП Z-Met на каталептогенное состояние мышей SHK, вызванное введением типичного нейрорептика галоперидола, вызывающего блокаду дофаминовых рецепторов nigrostriарной системы, позволяют сделать заключение об отсутствии непосредственного влияния исследуемого соединения на дофаминергическую систему. Следовательно, снижение выраженности симптомов ПС у мышей с МФТП-индуцированной экспериментальной патологией при введении Z-Met, вероятнее всего, обусловлено нейропротекторными свойствами соединения за счёт ингибирования ПЭП, активность которой повышается при нейродегенера-

тивных заболеваниях – в частности, БП, хотя это и требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания (проект № 0521-2019-0007).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Babkova K., Korabecny J., Soukup O., Nepovimova E., Jun D., Kuca K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors // *Future Med. Chem.* 2017. Vol. 9. N 10. P. 1015–1038.
2. Myohanen T.T., Hannula M.J., Van Elzen R., Gerard M., Van Der Veken P., Garcia-Horsman J.A., Baekelandt V., Mannisto P.T., Lambeir A.M. A prolyl oligopeptidase inhibitor, KYP-2047, reduces alpha-synuclein protein levels and aggregates in cellular and animal models of Parkinson's disease // *Brit. J. Pharmacol.* 2012. Vol. 166. N 3. P. 1097–1113.
3. Беседин Д.В., Руденская Г.Н. Пролинспецифические эндопептидазы // *Биоорг. хим.* 2003. Т. 29. № 1. С. 3–20.
4. Myohanen T.T., Venalainen J.I., Tupala E., Garcia-Horsman J.A., Miettinen R., Mannisto P.T. Distribution of immunoreactive prolyl oligopeptidase in human and rat brain // *Neurochem. Res.* 2007. Vol. 32. N 8. P. 1365–1374.
5. Tenorio-Laranga J., Montoliu C., Urios A., Hernandez-Rabaza V., Ahabrach H., Garcia-Horsman J.A., Felipe V. The expression levels of prolyl oligopeptidase responds not only to neuroinflammation but also to systemic inflammation upon liver failure in rat models and cirrhotic patients // *J. Neuroinflamm.* 2015. Vol. 12: 183.
6. Penttinen A., Tenorio-Laranga J., Siikanen A., Morawski M., Rossner S., Garcia-Horsman J.A. Prolyl oligopeptidase: a rising star on the stage of neuroinflammation research // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2011. Vol. 10. N 3. P. 340–348.
7. Natunen T.A., Gynther M., Rostalski H., Jaako K., Jalkanen A.J. Extracellular prolyl oligopeptidase derived from activated microglia is a potential neuroprotection target // *Basic Clin. Pharmacol.* 2019. Vol. 124. N 1. P. 40–49.
8. Hofling C., Kuleskaya N., Jaako K., Peltonen I., Mannisto P.T., Nurmi A., Vartiainen N., Morawski M., Zharkovsky A., Voikar V., Rossner S., Garcia-Horsman J.A. Deficiency of prolyl oligopeptidase in mice disturbs synaptic plasticity and reduces anxiety-like behaviour, body weight, and brain volume // *Eur. Neuropsychopharm.* 2016. Vol. 26. N 6. P. 1048–1061.
9. Hannula M.J., Myohanen T.T., Tenorio-Laranga J., Mannisto P.T., Garcia-Horsman J.A. Prolyl oligopeptidase colocalizes with alpha-synuclein, beta-amyloid, tau protein and astroglia in the post-mortem brain samples with Parkinson's and Alzheimer's diseases // *Neuroscience.* 2013. Vol. 242. P. 140–150.
10. Mannisto P.T., Venalainen J., Jalkanen A., Garcia-Horsman J.A. Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders // *Drug News Perspect.* 2007. Vol. 20. N 5. P. 293–305.
11. Dokleja L., Hannula M.J., Myohanen T.T. Inhibition of prolyl oligopeptidase increases the survival of alpha-synuclein overexpressing cells after rotenone exposure by reducing alpha-synuclein oligomers // *Neurosci. Lett.* 2014. Vol. 583. P. 37–42.
12. Di Daniel E., Glover C.P., Grot E., Chan M.K., Sanderson T.H., White J.H., Ellis C.L., Gallagher K.T., Uney J., Thomas J., Maycox P.R., Mudge A.W. Prolyl oligopeptidase binds to GAP-43 and functions without its peptidase activity // *Mol. Cell Neurosci.* 2009. Vol. 41. N 3. P. 373–382.
13. Myohanen T.T., Norrbacka S., Savolainen M.H. Prolyl oligopeptidase inhibition attenuates the toxicity of a proteasomal inhibitor, lactacystin, in the alpha-synuclein overexpressing cell culture // *Neurosci. Lett.* 2017. Vol. 636. P. 83–89.
14. Lashuel H.A., Overk C.R., Oueslati A., Masliah E. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14. N 1. P. 38–48.
15. Ivanova E.A., Zolotov N.N., Kapitsa I.G., Pozdnev V.F., Valdman E.A., Voronina T.A. Proline-specific endopeptidase and adenosine deaminase activity in blood serum and cerebrospinal fluid in experimental parkinson's syndrome // *Immunologiya.* 2017. Vol. 38. N 4. P. 213–218.
16. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Bogdanova N.G., Zolotov N.N. Effect of prolyl endopeptidase inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-2(s)-cyanopyrrolidine on activity of proline-specific peptidases in brain structures of rats with experimental MPTP-induced depressive syndrome // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. Vol. 155. N 6. P. 670–674.
17. Rocha E.M., De Miranda B., Sanders L.H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease // *Neurobiol. Dis.* 2018. Vol. 109. Part B. P. 249–257.
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
19. Blandini F., Armentero M.T. Animal models of Parkinson's disease // *FEBS J.* 2012. Vol. 279. N 7. P. 1156–1166.

Поступила в редакцию 25.01.2019 г.

После доработки 16.04.2019 г.

Принята в печать 23.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE ANTIPARKINSONIAN ACTION OF THE PROLYL ENDOPEPTIDASE INHIBITOR IN MICE

A.P. Kalinina*, I.G. Kapitsa, E.A. Ivanova, T.A. Voronina

Laboratory of Psychopharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Baltiyskaya ul. 8,
Moscow, 125315, Russia;

*e-mail: viburnum.fbm@gmail.com

Prolyl endopeptidase is involved in neurodegeneration, proliferation, neuroinflammation and neuron differentiation. It has been observed that severity of neurodegenerative process correlates with increasing level of prolyl endopeptidase in the brain. According to the recent research, prolyl endopeptidase might interact with prion-like proteins, which are believed to be the key players in the development of neurodegenerative diseases. Consequently, prolyl endopeptidase inhibitors might be a promising group of chemicals to study in neurodegenerative diseases, particularly Parkinson's disease. The aim of the research was to determine the effects of a new inhibitor of prolyl endopeptidase by haloperidol catalepsy test in SHK mice and MPTP induced Parkinson-like syndrome in C57Bl/6 mice. Neurotoxin MPTP (30 mg/kg, single intraperitoneal injection) was used to provide the specific dopaminergic damage in C57Bl/6 mice. As a result, the compound reduces the severity of main extrapyramidal symptoms: rigidity and motor deficits. However, the anticataleptic activity was not found. According to our results, the prolyl endopeptidase inhibitor does not effect on the dopaminergic neurons directly, but provides neuroprotection to the neurons.

Keywords: *prolyl endopeptidase, prolyl endopeptidase inhibitors, Parkinson-like syndrome, mice, Parkinson's disease, neurodegeneration*

Сведения об авторах

Калинина Анна Павловна – лаборант-исследователь, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; студентка факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: viburnum.fbm@gmail.com

Капица Инга Геннадиевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: ingakap73@mail.ru

Иванова Елена Анатольевна – канд. фарм. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Воронина Татьяна Александровна – докт. мед. наук, проф., зав. лабораторией психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: voroninata38@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.08

**НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ
ДЕНАТУРАЦИОННОЙ И БЕЗДЕНАТУРАЦИОННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ
IN SITU ПРИ ИЗУЧЕНИИ ХРОМОСОМ ЗЛАКОВ****В.М. Кузнецова^{1,2}, О.В. Разумова^{1,3}, Г.И. Карлов^{1,2}, Т.С. Данг², П.Ю. Крупин^{1,2},
М.Г. Дивашук^{1,2,*}**

¹Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42;

²Центр молекулярной биотехнологии РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49;

³Лаборатория молекулярной систематики, Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН, Россия, 127276 г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4
*e-mail: divashuk@gmail.com

Безденатурационная флуоресцентная гибридизация *in situ* (ND-FISH) – удобный метод цитогенетических исследований. По сравнению со стандартной методикой ND-FISH отличается скоростью и простотой исполнения, требует меньше времени, реактивов и приборной базы, поэтому набирает все большую популярность у разных групп ученых и используется для решения разнообразных научных задач. Однако при использовании данного метода для изучения хромосом злаков мы столкнулись с некоторыми особенностями его применения в сочетании с олигонуклеотидными пробками. В данной работе мы сравнили три модификации: два разных варианта денатурационного метода и безденатурационной FISH. В общепринятой методике FISH для растений и ее модификациях хромосомы подвергаются обработке с добавлением формамида при высокой температуре, в результате чего происходит денатурация сверхспирализованной ДНК хромосом растений. В методике безденатурационной FISH этот этап опущен, что позволяет сохранить структуру хромосом, экономит время и ресурсы. В нашей работе все методики показали свою эффективность. Безденатурационная ND-FISH отличается простотой и удобством, однако меньшей воспроизводимостью в ряде экспериментов. Стандартный метод и его модификация наиболее стабильны и надежны, но могут негативно сказываться на морфологии хромосом. При последовательных гибридизациях с использованием тех же препаратов (sequential FISH) мы рекомендуем сочетание данных методов – с первичным проведением FISH по стандартному протоколу и последующими гибридизациями методом ND-FISH.

Ключевые слова: *FISH, ND-FISH, безденатурационная гибридизация in situ, методы молекулярной цитогенетики, тритикале*

Кариотип – одна из важнейших характеристик вида. Со времен изобретения первого микроскопа и открытия хромосом методы исследования кариотипов все время совершенствовались. Таких классических морфологических маркеров хромосом, как положение центромеры, абсолютная и относительная длина хромосомы, размер и положение плеч и сателлитных регионов хромосом, недостаточно для надежной идентификации отдельных хромосом, особенно у растений, многие из которых являются мультигеномными, полиплоидными видами, объединяющими в своих кариотипах несколько групп гомеологичных хромосом.

С открытием ДНК и изобретением методов молекулярной цитогенетики проблема идентификации отдельных хромосом растений и построения надежных кариотипов получила новое решение. В свое время прорывом в области идентификации хромосом стало изобретение различных методов окрашивания хромосом, в частности, Q-, G-, C- и N-бэндинг. Основой для Q-бэндинга стала специфичная флуоресценция акрихина в AT-богатых регионах хроматина. Основой для G- и C-бэндинга стало специфичное связывание красителя Гимза с гетерохроматиновыми регионами хромосом, в результате чего появляется специфичная исчер-

ченность хромосом. N-бэндинг позволяет с помощью окрашивания хромосом раствором нитрата серебра выявлять ядрышкообразующие районы. Данные методы позволяют отличить отдельные хромосомы растений друг от друга. Однако эти методы имеют ряд существенных ограничений. Во-первых, не все виды обладают хромосомами с ярко выраженным чередованием эухроматиновых и гетерохроматиновых участков. Во-вторых, данные методы требуют наличия у растения достаточно крупных хромосом, чтобы можно было отличить бэнды друг от друга. В-третьих, такие подходы не позволяют визуализировать отдельные последовательности ДНК на хромосоме. Наконец, такого рода окрашивания не способны выявлять перестройки, которые произошли внутри эухроматиновых участков, или физически локализовать гены. В отличие от дифференциального окрашивания, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) не имеет этих ограничений, не связана с содержанием пуриновых и пиримидиновых оснований и имеет более широкие возможности. С использованием FISH можно увидеть локализацию любого достаточно протяженного (около 10 т.п.н. для FISH и менее 1 т.п.н. для модификации FISH) участка ДНК на хромосоме. К недостаткам этого метода можно отнести его высокую стоимость и трудоемкость. С использованием FISH решаются такие задачи, как выявление чужеродного генетического материала, идентификация гомологичных пар хромосом, изучение пола и половых хромосом, выполняются эволюционные и многие другие исследования [1–10]. В качестве зонда для FISH могут выступать меченые флуоресцентные специфичные последовательности ДНК (сателлитные повторы, EST-клоны, гены), геномная ДНК (такую модификацию принято называть геномной гибридизацией *in situ* – GISH), Cot-фракция ДНК, микросателлитные последовательности и т.д. Для мечения ДНК обычно используют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) либо ник-трансляцию или используют в качестве пробы короткие синтезированные олигонуклеотидные последовательности. Со времен изобретения метода и адаптации его для изучения растений было создано множество модификаций стандартного протокола FISH (BAC-FISH, FAST-FISH). Одной из таких модификаций, получившей широкое распространение благодаря скорости и удобству, стал метод безденатурационной FISH (non-denaturing fluorescence *in situ* hybridization – ND-FISH). В данной модификации денатурация хромосом не происходит, зонд гибридизуется с ДНК хромосом в течение часа без длительной предварительной подготовки и последующих долгих отмывок. Данный метод получает все более широкое распространение в цитогене-

тических исследованиях растений [4, 5, 11–13]. В данной работе мы сравнили эффективность трех методик FISH: два варианта денатурационного метода: по стандартной методике с небольшими модификациями [14] (denaturing fluorescence *in situ* hybridization – D-FISH) и по Като [15, 16], а также ND-FISH [3] для исследования злаков с использованием синтезированных олигонуклеотидных зондов с флуорофорами.

Материалы и методы

Исследования выполнялись на тритикале (*Triticale*) сорта Соловей Харьковский (геномный состав ABR; $2n=6x=42$). Для приготовления препаратов метафазных хромосом использовали корневые меристемы. Для получения молодых активно растущих корней растения круглогодично выращивались в теплице.

Предфиксационную обработку проводили в насыщенном растворе α -бромнафталина при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение суток. Фиксацию предроботанных корневых меристем проводили в 45%-ной уксусной кислоте, после чего зафиксированный материал хранили также в 45%-ной уксусной кислоте при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ не более двух недель. Постоянные давленные препараты готовили после обработки корневых меристем ферментами. Раствор ферментов содержал 0,01% пектиназы и целлюлазы (Sigma-Aldrich, Германия) в цитратном буфере (pH 4,8). После приготовления препараты помещали в жидкий азот для фиксации хромосом на стекле.

В работе было апробировано три модификации флуоресцентной гибридизации *in situ*. Первая модификация, названная нами «стандартным» методом FISH (denaturing fluorescence *in situ* hybridization – D-FISH), включала в себя следующие этапы. Для первичной дегидратации стекла помещали на ночь в термостат при температуре 37°C . Подготовку препаратов начинали с обработки раствором РНКазы в концентрации 100 мкг/л (1:100) в двухкратном высокосолевым цитратном буфере (2xSSC, saline sodium citrate), добавляя на каждое предметное стекло 100 мкл раствора. Накрывали покровным стеклом и инкубировали во влажной камере 1 ч при 37°C . После трехкратной промывки в буфере 2xSSC стекла 10 мин инкубировали в 4%-ном параформальдегиде. Затем опять следовали трехкратная отмывка в 2xSSC и дегидратация с использованием батареи спиртов (в 70%-ном, 90%-ном и 96%-ном этаноле по 3 мин в каждом). Далее следовала гибридизация. Смесь для гибридизации состояла из 20 мкл формамида, 8 мкл 50%-ного декстрансульфат, 4 мкл 20xSSC, 1 мкл 10%-ного раствора натриевой соли лаурилсерной кислоты (SDS, sodium dodecyl sulfate), 20 нг/стекло олигонуклеотидного зонда. Смесь для

гибридизации предварительно нагревали до 70°C, а затем быстро, перед нанесением, охлаждали на льду. Денатурацию проводили при 80°C в течение 5 мин, а затем оставляли во влажной камере при 37°C на ночь. На второй день проводили отмывку стекол от смеси в растворе 2x SSC при 42°C 15 мин на водяной бане с качалкой. После отмывки проводили контр-окрашивание 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (1:100 в 2xSSC) 10 мин и заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США).

Вторая методика D-FISH подробно описана у Комуро [15] и Като [16]. Первые этапы, до момента гибридизации, не отличаются от описанного метода стандартной гибридизации *in situ*. Синтезированные олигонуклеотидные зонды с флуорофорами (20 нг/стекло) растворяются непосредственно в двухкратном высокосолевоом цитратном буфере (2xSSC), без других компонентов. Денатурация проводится на кипящей водяной бане при 100°C. После этого препараты охлаждают, помещая на лед. Методика требует определенных технических навыков, поскольку из-за высокой температуры денатурации стекла помещают в камеру особым образом. Инкубация и отмывка происходят при 55°C, отмывку стекол от гибридизационной смеси проводят в растворе 2xSSC с добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты с концентрацией в течение 20 мин. Далее проводится контр-окрашивание DAPI аналогично стандартной методике.

Безденатурационная FISH (non-denaturing fluorescence *in situ* hybridization – ND-FISH) также начинается с дегидратации путем инкубирования препаратов при 37°C всю ночь. Далее, без предварительных обработок, добавляли на стекла смесь для гибридизации (20 нг/стекло), состоящую только из необходимых зондов, разведенных в 2xSSC (1:100), и помещали в водяную баню на 42°C (1,5 ч). Отмывку от гибридизационной смеси проводили в течение 5 мин в 2xSSC при комнатной температуре. Контр-окрашивание DAPI проводили 20 мин при комнатной температуре (1:100) и заключали стекла в 15 мкл среды Vectashield.

Визуализация результатов проводилась на микроскопе Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой Axio Cam MRm Digital с использованием программного обеспечения AxioVision 4.6.

Прямые олигонуклеотидные зонды синтезировали в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия). В работе использовали пробу Oligo-pSc119.2-2, меченную флуоресцентными красителями тетраметилродамином (TAMRA) или карбоксифлуоресцеином (FAM) [3].

В каждом изучаемом варианте использовали 16 препаратов. Для нивелирования влияния синтеза зонда и используемого флуорофора на 8

препаратах использовали пробу Oligo-pSc119.2-2TAMRA и на 8 препаратах – Oligo-pSc119.2-2-FAM с флуоресцентными красителями, ковалентно пришитыми к 5'-концу пробы [3].

Все препараты были приготовлены из одной партии одинаково и одновременно предобработанными и зафиксированными корешков.

Для последовательной FISH (sequential *in situ* hybridization) препараты отмывали по методике, описанной у Комуро [15], а далее использовали согласно следующему выбранному протоколу исследований. После каждой отмывки проводили окрашивание препаратов DAPI и анализировали, все ли зонды были удалены с хромосом. В случае наличия проб после отмывки процедура отмывки повторялась или препарат отбраковывался.

Результаты и обсуждение

Все проанализированные нами методы FISH позволили провести гибридизацию исследуемых зондов с ДНК хромосом. Однако в ходе выполнения работ были выявлены некоторые различия, которые описаны ниже.

Стандартный метод D-FISH. Все шестнадцать препаратов, исследованных с использованием данной методики, показали гибридизацию со всеми изученными зондами.

Несомненным достоинством данного метода является его стабильность. Все препараты со всеми зондами во всех экспериментах неизменно показывали один и тот же хороший результат. Были четко видны как яркие, мажорные блоки гибридизации зонда с ДНК хромосом, так и минорные сигналы. Результаты воспроизводились и были статистически достоверными.

Главным недостатком данного протокола следует считать его длительность (2 сут) и многокомпонентность смеси для гибридизации. Кроме того, в случае повторного использования препарата для последовательного-D-FISH (особенно на третий и последующие разы) возможны потери отдельных участков и даже целых хромосом. Условия денатурации в процедуре D-FISH (высокая температура, наличие формамида), а также жесткие условия отмывки зондов, разрушают структуру хромосом, и повторное многократное использование препаратов становится затруднительным. Между тем, возможность локализовать разные пробы на одни и те же метафазные пластинки хромосом широко применяется в работах разных исследователей и очень ценна для решения определенных задач [6, 16–20].

Нами было выявлено несколько случаев кросс-контаминации коротких олигонуклеотидных зондов с препарата на препарат. Такое явление наблюдалось только при использовании в качестве зонда прямых олигонуклеотидов, при

гибридизации разных проб в одном эксперименте D-FISH. Мы связываем это явление с ограниченным объемом емкости для окрашивания препаратов, вязкостью гибридизационной смеси за счет использования 50%-ного декстрансульфата, неудачным расположением препаратов в емкости Хеллендаля (ориентацией «лицом к лицу»), большой концентрацией олигонуклеотидов в смеси, их коротким размером и универсальностью. Сочетание данных факторов приводит к тому, что у препаратов, обращенных друг к другу, длительно стоящих рядом при отмывке после гибридизации, зонды выходят в раствор буфера для отмывки, однако вязкая смесь для гибридизации на основе густого декстрансульфата не позволяет олигонуклеотидам раствориться в буфере и концентрация их локально повышается, что приводит к нежелательной кросс-гибридизации. Впервые обнаружив кросс-контаминацию зондов с препарата на препарат, мы провели дополнительные эксперименты с D-FISH для проверки нашей гипотезы. Препарат, в гибридизационную смесь которого не добавлялся зонд, помещали в сосуд Хеллендаля при отмывках после гибридизации рядом с препаратом с зондом ориентацией «лицом к лицу». После проведения стандартного протокола D-FISH сигналы были обнаружены на обоих препаратах. Ранее нам не встречалось описание подобных проблем в литературе. Такое явление наблюдалось только при использовании для гибридизации олигонуклеотидных зондов, и только при проведении денатурационной D-FISH с использованием смеси на основе декстрансульфата, однако отсутствовало в случае ND-FISH или при использовании зондов, приготовленных другими способами (зонды, полученные полимеразной цепной реакцией или ник-трансляцией). Для исключения случайной гибридизации мы рекомендуем проведение параллельных отмывок с использованием разных сосудов Хеллендаля. Такой проблемы не существует, если при проведении D-FISH используется только одна проба.

Метод D-FISH no Kamo, 2011. Данный метод несколько отличается от предыдущего варианта высокой (около 100°C) температурой денатурации, повышенной температурой во время отмывки, использованием специальной конструкции при гибридизации и отсутствием формамида в составе смеси для гибридизации. С точки зрения воспроизводимости результатов и стабильности, отличий от обычного стандартного метода D-FISH выявлено не было. Структура и морфология хромосом после проведения гибридизации с использованием данной методики также нарушается, и при повторном использовании препаратов для FISH гибридизация может получиться не очень удачной. Однако случаев «перехода» олигонуклеотид-

ной пробы со стекла на стекло отмечено не было. По-видимому, это связано с отсутствием такого вязкого компонента как 50%-ный декстрансульфат. В целом оба метода D-FISH показали стабильные результаты на всех препаратах и некоторое падение качества D-FISH при нескольких процедурах последовательной (повторной) гибридизации (sequential FISH).

ND-FISH. Метод безденатурационной FISH отличается простотой исполнения. Проба добавляется в раствор буфера 2xSSC, гибридизация происходит при 42°C в течение непродолжительного времени, после чего можно сразу приступить к контр-окрашиванию и визуализировать результат. Таким образом, по сравнению с традиционным методом, на сутки сокращается время проведения исследования, снижается расход реактивов и стоимость анализов. К безусловным достоинствам данной модификации также можно отнести и большую сохранность структуры хромосом, связанную с меньшим количеством различных температурных и химических воздействий, которым они подвергаются в процессе гибридизации при классических методах D-FISH.

Однако нами было отмечено, что результаты ND-FISH не всегда стабильны. Так, полностью

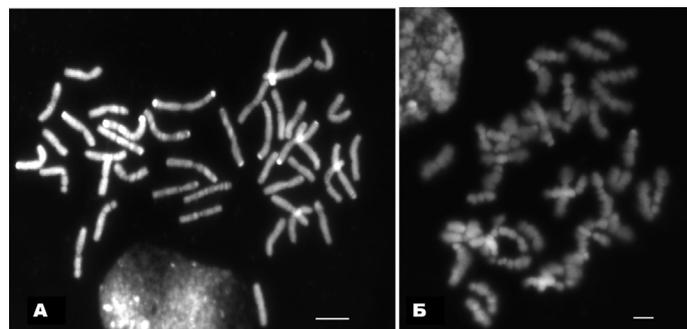


Рисунок. Морфология метафазных хромосом тритикале после трех процедур последовательной FISH. А. Последовательность процедур: D-FISH – ND-FISH – ND-FISH. Б. Последовательность процедур: D-FISH – D-FISH – D-FISH. Размер шкалы – 10 мкм.

успешной (наличие мажорных и минорных сигналов) оказалась гибридизация только на 10 препаратах из 16. На 4 препаратах было отмечено отсутствие большого количества минорных фрагментов на хромосомах, и на 2 препаратах гибридизация вовсе не наблюдалась. Поэтому для получения стабильных результатов, по-видимому, необходимо увеличивать количество повторностей при постановке экспериментов. Особенно требуется контролировать результаты, получаемые с ND-FISH при постановках *de novo* – при использовании проб с неизвестной локализацией (например, цитогенетический анализ данных полногеномного секвенирования) или переносе проб из одного вида в другой. С другой стороны, мы протести-

ровали процедуру безденатурационной гибридизации *in situ* при последовательной FISH после стандартной гибридизации *in situ* (по 5 препаратов на каждый вариант). Во всех случаях мы получили отличный стабильный результат. Кроме того, структура хроматина при использовании безденатурационного метода при последовательной FISH оставалась стабильной вплоть до четырех отмывок/гибридизаций (рисунок). По-видимому, такое существенное улучшение стабильности получаемых результатов для ND-FISH при последовательной FISH по сравнению с использованием этого метода в качестве первичной процедуры связано со сверхспирализованностью ДНК хромосом растений (в частности, злаков). При стандартном денатурационном методе для первой процедуры D-FISH мы частично убираем данную сверхспирализованность, что значительно облегчает дальнейшую процедуру ND-FISH.

Таким образом, мы провели сравнение трех модификации FISH с использованием меченых олигонуклеотидных зондов на хромосомах тритикале. Нами была отмечена относительная нестабильность безденатурационной гибридизации *in situ* (ND-FISH) при ее использовании в качестве первичной процедуры на препаратах, что свидетельствует о необходимости усилить контроль за

достоверностью результатов в случае, когда предпочтение отдается именно этой методике. Однако сохранность хромосом является значительным преимуществом данной модификации. Оптимальной схемой для наших исследований оказалось сочетание стандартной методики D-FISH для локализации проб на хромосомы с дальнейшими сериями последовательной FISH с использованием безденатурационного метода. В таком случае, во-первых, повышается стабильность ND-FISH, а во-вторых, меньше страдает морфология хромосом, что позволяет более длительное время использовать препарат и проводить на одном препарате до четырех процедур последовательной FISH. Нами впервые была отмечена проблема кросс-контaminaции на соседние препараты при использовании традиционной методики и олигонуклеотидных проб. Мы рекомендуем проводить отмывки после гибридизации в разных сосудах во избежание кросс-гибридизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00097).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosato M., Álvarez I., Nieto Feliner G., Rosselló J.A. High and uneven levels of 45S rDNA site-number variation across wild populations of a diploid plant genus (*Anacyclus*, Asteraceae) // PLoS ONE. 2017. Vol. 12. N 10: e0187131.
2. Han F.P., Lamb J.C., Birchler J.A. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. Vol. 103. N 9. P. 3238–3243.
3. Tang Z.X., Yang Z.J., Fu S.L. Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119.2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC.1 for FISH analysis // J. Appl. Genet. 2014. Vol. 55. N 3. P. 313–318.
4. Fu S.L., Chen L., Wang Y.Y., Li M., Yang Z.J., Qiu L., Yan B.J., Ren Z.L., Tang Z.X. Oligonucleotide probes for ND-D-FISH analysis to identify rye and wheat chromosomes // Sci. Rep. 2015. Vol. 5: 10552.
5. Xiao Z., Tang S., Qiu L., Tang Z., Fu S. Oligonucleotides and ND-FISH displaying different arrangements of tandem repeats and identification of *Dasyphyrum villosum* chromosomes in wheat backgrounds // Molecules. 2017. Vol. 22. N 6: 973.
6. Badaeva E.D., Amosova A.V., Goncharov N.P., Macas J., Ruban A.S., Grechishnikova I.V., Zoshchuk S.A., Houben A. A set of cytogenetic markers allows the precise identification of all A-genome chromosomes in diploid and polyploidy wheat // Cytogenet. Genome Res. 2015. Vol. 146. N 1. P. 71–79.
7. Li G.R., Gao D., Zhang H.G., Li J.B., Wang H.J., La S.X., Ma J.W., Yang Z.J. Molecular cytogenetic characterization of *Dasyphyrum breviaristatum* chromosomes in wheat background revealing the genomic divergence between *Dasyphyrum* species // Mol. Cytogenet. 2016. Vol. 9. N 1: 6.
8. Du P., Zhuang L.F., Wang Y.Z., Yuan Q., Wang D.R., Dawadondup, Tan L.J., Shen J., Xu H.B., Zhao H. Development of oligonucleotides and multiplex probes for quick and accurate identification of wheat and *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes // Genome. 2017. Vol. 60. N 2. P. 93–103.
9. Puterova J., Razumova O., Martinek T., Alexandrov O., Divashuk M., Kubat Z., Hobza R., Karlov G., Kejnovsky E. Satellite DNA and transposable elements in seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*), a dioecious plant with small Y and large X chromosomes // Genome Biol. Evol. 2017. Vol. 9. N 1. P. 197–212.
10. Xin H., Zhang T., Han Y., Wu Y., Shi J., Xi M., Jiang J. Chromosome painting and comparative

physical mapping of the sex chromosomes in *Populus tomentosa* and *Populus deltoides* // *Chromosoma*. 2018. Vol. 127. N 3. P. 313–321.

11. Tang S., Tang Z., Qiu L., Yang Z., Li G., Lang T., Zhu W., Zhang J., Fu S. Developing new Oligo probes to distinguish specific chromosomal segments and the A, B, D genomes of wheat (*Triticum aestivum* L.) using ND-FISH // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9: 1104.

12. Jiang M., Xiaio Z.Q., Fu S.L., Tang Z.X. FISH karyotype of 85 common wheat cultivars/lines displayed by ND-FISH using oligonucleotide probes // *Cereal Res. Commun.* 2017. Vol. 45. N 4. P. 549–563.

13. Kirov I.V., Kiseleva A.V., Van Laere K., Van Roy N., Khrustaleva L.I. Tandem repeats of *Allium fistulosum* associated with major chromosomal landmarks // *Mol. Genet. Genomics*. 2017. Vol. 292. N 2. P. 453–464.

14. Alexandrov O.S., Karlov G.I. Molecular cytogenetic analysis and genomic organization of major DNA repeats in castor bean (*Ricinus communis* L.) // *Mol. Genet. Genomics*. 2016. Vol. 291. N 2. P. 775–787.

15. Komuro S., Endo R., Shikata K., and A. Kato. Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence *in situ* hybridization procedure // *Genome*. 2013. Vol. 56. N 3. P. 131–137.

16. Kato A. High-density fluorescence *in situ* hybridization signal detection on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosomes with improved probe

screening and reprobing procedures // *Genome*. 2011. Vol. 54. N 2. P. 151–159.

17. Iwata-Otsubo A., Radke B., Findley S., Abernathy B., Vallejos C.E., Jackson S.A. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)-based karyotyping reveals rapid evolution of centromeric and subtelomeric repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*) and relatives // *G3: Genes, Genom., Genet.* 2016. Vol. 6. N 4. P. 1013–1022.

18. Badaeva E.D., Ruban A.S. Evolution of the S-genomes in *Triticum-Aegilops* alliance: evidences from chromosome analysis // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9: 1756.

19. Badaeva E.D., Ruban A.S., Aliyeva-Schnorr L., Municio C., Hesse S., Houben A. *In situ* hybridization to plant chromosomes // *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Springer Protocols Handbooks / Ed. T. Liehr. Berlin, Heidelberg: Springer, 2017. P. 477–494.

20. Lang T., Li G., Wang H., Yu Z., Chen Q., Yang E., Fu S., Tang Z., Yang Z. Physical location of tandem repeats in the wheat genome and application for chromosome identification // *Planta*. 2018. Vol. 249. N 3. P. 663–675.

Поступила в редакцию 17.12.2018 г.

После доработки 17.04.2019 г.

Принята в печать 23.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SOME PECULIARITIES OF APPLICATION OF DENATURATIVE AND UNDENATURATED D-FISH METHODS ON CHROMOSOMES OF CEREALS

V.M. Kuznetsova^{1,2}, O.V. Razumova^{1,3}, G.I. Karlov^{1,2}, T.X. Dang², P.Y. Kroupin^{1,2}, M.G. Divashuk^{1,2,*}

¹Laboratory of Applied Genomics and Crop Breeding, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskay str. 42, Moscow, 127550, Russia;

²Center for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University – MTAА, Timiryazevskay str. 49, Moscow, 127550, Russia;

³Laboratory of Molecular Systematics, N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, Botanicheskay str. 4, Moscow, 127276, Russia

*e-mail: divashuk@gmail.com

Non-denaturing fluorescent *in situ* hybridization (ND FISH) is a convenient method of cytogenetic research. Compared to the standard method, ND FISH is fast and easy to perform, requires less time, reagents and tools, so it is gaining increasing popularity among different groups of scientists and used to accomplish various scientific tasks. However, when using this method to visualize the chromosomes of wheat and its wild relatives, we faced some peculiarities of its application when

oligonucleotide probes are used. In this paper, we compare three following methods, two different versions of the denaturation method and the denaturation FISH. In the standard procedure and its modifications, chromosomes are treated with formamide at high temperature that results in the denaturation of supercoiled DNA of plant chromosomes. In the non-denaturing FISH, this step is omitted that makes it possible to keep the native chromosome structure and, thus, is more time and cost effective. In our work, all methods demonstrated their efficiency. Non-denaturing FISH is characterized by ease and convenience, but less reproducibility in a series of experiments. The standard protocol and its modifications are most stable and reliable, but negatively affect chromosome morphology. In successive hybridizations on the same slide (sequential FISH), we recommend a combination of these methods, with primary testing using a standard protocol and subsequent hybridization using the ND-FISH method.

Keywords: *FISH, ND FISH, non-denatured in situ hybridization, molecular cytogenetics methods, triticealeon*

Сведения об авторах

Кузнецова Виктория Максимовна — мл. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ВНИИСБ; лаборант-исследователь центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-70-01; e-mail:

vika-kuz367@yandex.ru

Разумова Ольга Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ВНИИСБ; науч. сотр. лаборатории молекулярной систематики ГБС им. Н.В. Цицина РАН. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail:

razumovao@gmail.com

Карлов Геннадий Ильич — докт. биол. наук, проф., член-корр. РАН, директор ВНИИСБ. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: *karlov@iab.ac.ru*

Данг Тхи Суан — магистр РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-70-01; e-mail: *hixi.dang91@gmail.com*

Крупин Павел Юрьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ВНИИСБ; ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-70-01; e-mail: *pavelkroupin1985@gmail.com*

Дивашук Михаил Георгиевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ВНИИСБ; ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-70-01; e-mail: *divashuk@gmail.com*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.355.2

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОНОВ ТЕРБИЯ С ДОНОРНОЙ СТОРОНОЙ ФОТОСИСТЕМЫ 2 ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

А.В. Локтюшкин*, Е.Р. Ловягина, Б.К. Семин

*Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: allokt@gmail.com

Фотосистема 2 (ФС2) высших растений осуществляет фотоиндуцированное окисление воды и выделение в атмосферу молекулярного кислорода в качестве побочного продукта этой реакции. Кислород-выделяющий комплекс (КВК) расположен на донорной стороне ФС2 и содержит Mn_4CaO_5 -кластер, катализирующий окисление воды. Кофактором этой реакции является катион Ca^{2+} . По некоторым физико-химическим свойствам (ионный радиус, координационное число) к ионам Ca^{2+} близки ионы лантаноидов, и в кальций-связывающих белках возможно замещение Ca^{2+} на эти катионы. Отдельные представители данной группы катионов могут связываться и с Ca -связывающим участком ФС2. Нами было исследовано взаимодействие с донорной стороной ФС2 одного из наименее изученных лантаноидов – тербия. Результаты проведенных экспериментов показали, что инкубация нативных препаратов ФС2 с катионами Tb^{3+} приводит к необратимому ингибированию функции выделения кислорода (на $\approx 75\%$ при 2 мМ Tb^{3+}). При этом электронный транспорт к переносчикам на акцепторной стороне ФС2 в значительной степени сохраняется. Добавление в среду инкубации 30 мМ Ca^{2+} уменьшает ингибирующий эффект тербия примерно вдвое. Полученные результаты хорошо соотносятся с данными измерений кинетики индукции флуоресценции в препаратах ФС2 в присутствии экзогенного Ca^{2+} и Tb^{3+} , а также позволяют предположить, что катионы тербия вытесняют Ca^{2+} из КВК. В результате замещения катиона кальция катионом тербия в каталитическом центре окисление воды происходит не до молекулярного кислорода, а до пероксида водорода, как это было показано нами ранее для ФС2 без Ca^{2+} в КВК.

Ключевые слова: фотосистема 2, кислород-выделяющий комплекс, кинетика индукции флуоресценции, кальций, лантаноиды, тербий

Фотосистема 2 (ФС2) – пигмент-белковый комплекс, связывающий ряд переносчиков электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза цианобактерий, водорослей и высших растений. Белок D1 ядра ФС2 несет марганцевый кластер, обеспечивающий окисление воды и выделение молекулярного кислорода. Фотосинтетическое выделение O_2 является практически единственным источником этого газа в атмосфере Земли.

Структурные исследования показали, что активный центр кислород-выделяющего комплекса (КВК) содержит четыре иона Mn и один ион Ca^{2+} , соединенные пятью кислородными мостиками (Mn_4CaO_5 -кластер). Кластер связывает четыре молекулы воды и координируется одной имидазольной и шестью карбоксильными группами аминокислотных остатков белков D1 и CP43 ФС2 [1]. Ион Ca^{2+} является необходимым кофактором

реакции окисления воды [2], однако необходимо отметить, что пространственная структура марганцевого кластера при удалении катиона кальция изменяется незначительно. Предполагаемая роль Ca^{2+} в КВК состоит либо в «подстройке» окислительно-восстановительного потенциала марганцевого кластера [3], либо в связывании одной или двух молекул субстратной (окисляемой в ходе каталитического цикла) воды [4]. Тем не менее, конкретный механизм участия ионов Ca^{2+} в функционировании КВК до сих пор не установлен [3].

С кальций-связывающим участком КВК могут взаимодействовать и другие ионы металлов. При этом лишь инкубация препаратов ФС2 без Ca^{2+} с ионами Sr^{2+} приводит к частичному восстановлению функции выделения O_2 [5]. По некоторым физико-химическим свойствам (ионный радиус, координационное число) к ионам Ca^{2+}

также близки ионы лантаноидов Ln^{3+} , что делает их удобным инструментом исследования кальций-связывающих белков. Эффекты замещения Ca^{2+} на лантаноиды Ln^{3+} могут быть различными: от сохранения до полной утраты активности в зависимости от того, структурную или каталитическую роль в кальций-связывающем белке выполняет катион кальция [5]. Таким образом, наблюдаемый эффект непосредственно связан с конкретным механизмом участия кальция в функционировании исследуемого белка. Действие ионов лантаноидов Ln^{3+} на фотосинтетический аппарат интересно и с другой точки зрения. В связи с широким использованием их в промышленности в настоящее время становится актуальной проблема загрязнения окружающей среды этими элементами [6]. Очевидно, что в этих условиях лантаноиды могут выступать в роли токсикантов, снижающих выход фотосинтеза – основного биохимического процесса, обеспечивающего продуктивность растений.

Влияние некоторых лантаноидов на функциональную активность ФС2 изучалось в ряде работ [7–9]. Несмотря на то, что все лантаноиды проявляют весьма сходные химические свойства, были выявлены значительные различия в действии конкретных ионов на функционирование ФС2, связанные, вероятно, с их ионным радиусом [7]. В настоящей работе нами установлено, что ионы одного из малоизученных лантаноидов, тербия, снижают скорость выделения кислорода ФС2, при этом добавление экзогенного Ca^{2+} оказывает выраженное действие на КВК, защищающее от ингибирующего действия Tb^{3+} .

Материалы и методы

Препараты ФС2. Мембранные препараты ФС2 с функциональным КВК были приготовлены из рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. согласно ранее опубликованной методике [10]. Все процедуры проводили при 4°C. Листья освобождали от жилок и гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ трицин (*N*-(2-гидрокси-1,1-бис(гидроксиэтил)этил)глицин), 400 мМ сахарозу, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl_2 , pH 7,8. Гомогенат фильтровали через четыре слоя капрона и освобождали от крупных фрагментов центрифугированием при 300g в течение 1 мин. Тилакоидные мембраны осаждали при 5000g в течение 5 мин и суспендировали в буфере А следующего состава: 400 мМ сахарозы, 15 мМ NaCl, 50 мМ MES (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота), pH 6,5. Полученный препарат тилакоидных мембран обрабатывали в течение 30 мин детергентом Тритон X-100 при соотношении детергент:хлорофилл – 20:1. После солюбилизации препарат центрифугировали 30 мин при 40000g.

Осадок частиц ФС2 ресуспендировали в буфере А и хранили при температуре –80°C. Для экстракции ионов Mn и периферических белков частицы ФС2 инкубировали в течение 15 мин в 0,8 М Трис-буфере (трис(гидроксиэтил)аминометан) с pH 8,5 при комнатной температуре и освещении (концентрация хлорофилла 0,5 мг/мл). Суммарную концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяли в 80%-ном растворе ацетона согласно описанной ранее методике [11]. Все измерения проводили в буфере А при концентрации хлорофилла 10 мкг/мл. Раствор $\text{Tb}_2(\text{SO}_4)_3$ (5 мМ) также готовили на буфере А. Перед измерениями препараты ФС2 инкубировали с Tb^{3+} при комнатной температуре в течение 5 мин в темноте.

Активность препаратов ФС2. Кинетику фотоиндуцированного выделения кислорода препаратами ФС2 регистрировали амперометрически с помощью закрытого электрода Кларка и полярографа LP-7e (Laboratorni Pstroje, Чехословакия) в термостатируемой ячейке при 25°C в присутствии искусственного акцептора электронов 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона (200 мкМ). Скорость выделения O_2 рассчитывали по линейному участку кинетической кривой за первые 10 с после включения света. Для калибровки величины диффузионного тока использовали значение концентрации кислорода в воде в равновесии с воздухом, равное 253 мкМ. Источниками возбуждающего света служили светодиоды XBDR0Y (Cree Inc., США) с максимумом 450 нм, обеспечивающие насыщающую интенсивность света ($1500 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$).

Кинетика индукции флуоресценции (КИФ). Кинетику индукции флуоресценции регистрировали с помощью прибора Plant Efficiency Analyzer (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) при постоянном освещении $1200 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Источником возбуждающего света служил светодиод с максимумом излучения 650 нм (спектральный диапазон 580–710 нм). Временное разрешение составляло 10 мкс в течение первых 2 мс регистрации интенсивности флуоресценции, 1 мс – в диапазоне 0,002–1 с и 100 мс – в диапазоне 1–2 с. При построении КИФ использовали логарифмическую шкалу по оси времени. Кривые нормировали на величину сигнала через 50 мкс после включения света.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 (кривая 1) приведена зависимость активности ФС2, определенной по скорости выделения кислорода, от концентрации ионов тербия. Поскольку в экспериментах был использован сульфат тербия, предварительно мы убедились, что сульфат-ионы (в этом эксперименте использовали соль Na_2SO_4) не оказывают влияния на O_2 -активность ФС2. В исследованном нами диа-

пазоне концентраций Tb^{3+} (50 мкМ–2 мМ) и при длительности инкубации с катионом металла 5 мин наблюдается выраженное снижение скорости выделения кислорода мембранными препаратами ФС2. При максимальной использованной концентрации 2 мМ активность снижается до 26% от контрольного уровня. Аналогичный эффект был обнаружен при обработке ФС2 другим лантаноидом – лантаном [9]. При этом следует отметить, что 2 мМ La^{3+} практически полностью (на 94%) ингибировал выделение кислорода ФС2, в то время как в присутствии 2 мМ Tb^{3+} мы наблюдали снижение активности лишь на 74%. Однако при исследовании влияния лантаноида самария в концентрации 0,5 мМ на мембранные препараты ФС2 наблюдалось существенно меньшее ($\approx 20\%$) ингибирование кислород-выделяющей активности [7]. Аналогичные концентрации лантана [9] и тербия (рис. 1) снижали скорость выделения кислорода приблизительно на 40% и 50%, соответственно. Таким образом, несмотря на сходство лантаноидов по физико-химическим свойствам, их ингибирующее действие на ФС2 различно.

Обратимость ингибирующего действия ионов

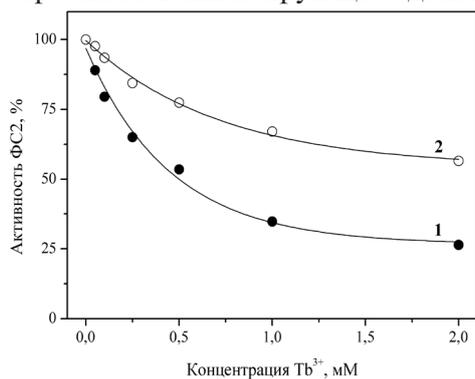


Рис. 1. Зависимость скорости выделения кислорода частицами ФС2 от концентрации Tb^{3+} в отсутствие (1) и в присутствии (2) 30 мМ $CaCl_2$. Активность 100% соответствует скорости выделения кислорода 390–430 мкмоль $O_2 \cdot мг Хл^{-1} \cdot ч^{-1}$ в отсутствие $CaCl_2$ и 430–470 мкмоль $O_2 \cdot мг Хл^{-1} \cdot ч^{-1}$ – в присутствии $CaCl_2$.

тербия мы проверили в следующих экспериментах. Обработанные 2 мМ Tb^{3+} частицы ФС2 (0,05 мг хлорофилла/мл) осаждали центрифугированием при 16100g в течение 10 мин и ресуспендировали в буфере А, не содержащем Tb^{3+} . После трехкратной отмывки буфером А активность препаратов не восстанавливалась и составляла 27% от контроля (активность ФС2, не обработанной тербием). Таким образом, ингибирование выделения кислорода частицами ФС2 в присутствии Tb^{3+} является необратимым.

Одним из механизмов ингибирования активности ФС2 ионами Tb^{3+} может быть нефункциональное замещение ионом тербия катиона Ca^{2+} в КВК. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали влияние экзогенного кальция на ин-

гибирующий эффект тербия. На рис. 1 (кривая 2) приведена зависимость скорости выделения кислорода ФС2 в присутствии 30 мМ $CaCl_2$ от концентрации Tb^{3+} . Хорошо видно, что при наличии в среде ионов кальция ингибирующий эффект тербия выражен значительно слабее. Так, в присутствии 30 мМ Ca^{2+} и 2 мМ Tb^{3+} активность препаратов ФС2 снижается лишь на 43% (в то время как без Ca^{2+} – на 74%). Полученные результаты позволяют предположить, что защитное действие Ca^{2+} от ингибирования ионами Tb^{3+} может быть обусловлено конкуренцией между этими ионами за участок (или участки) связывания в КВК ФС2.

Для более детального понимания механизма ингибирования электронного транспорта в ФС2 тербием мы использовали метод регистрации КИФ. Анализ формы КИФ позволяет получить информацию о кинетике переноса электрона на конкретных участках ЭТЦ ФС2 [12]. Очевидным преимуществом данного метода является отсутствие необходимости использовать для измерения скорости электронного транспорта экзогенные акцепторы. Типичная КИФ нативных препаратов ФС2, построенная в общепринятых полулгарифмических координатах, приведена на рис. 2 (кривая 1). На КИФ препаратов ФС2 обычно выделяют два участка – О-Ж и Ж-Р, тогда как в КИФ листьев, водорослей и цианобактерий обычно присутствует плато I, расположенное между пиками Ж и Р [12]. Первый участок О-Ж отражает процесс восстановления первичного хинонного акцептора ФС2 Q_A . Рост интенсивности флуоресценции на втором участке Ж-Р связан с полным восстановлением как первичного, так и вторич-

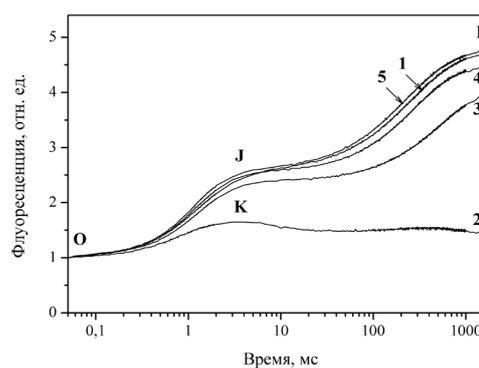


Рис. 2. Кривые индукции флуоресценции различных препаратов ФС2: 1 – контроль (нативная ФС2); 2 – ФС2 после экстракции Mn из КВК; 3 – ФС2 в присутствии 2 мМ Tb^{3+} ; 4 – ФС2 в присутствии 30 мМ $CaCl_2$ и 2 мМ Tb^{3+} ; 5 – ФС2 в присутствии 30 мМ $CaCl_2$.

ного хинонного акцептора Q_B . Экстракция Mn из КВК ФС2 путем обработки раствором Триса в щелочной среде приводит к существенному изменению формы КИФ (кривая 2 на рис. 2). После начального незначительного возрастания интенсивности флуоресценции в результате переноса

одного электрона с донорной на акцепторную часть ФС2 наблюдается её падение, в результате чего на КИФ появляется пик К. В данном случае начальное нарастание флуоресцентного сигнала связано с восстановлением первичного акцептора Q_A , а последующее падение обусловлено окислением Q_A^- пластохиноном Q_B и остатком тирозина Y_Z^+ белка D1 (в реакции рекомбинации $Y_Z^+ Q_A^-$) в условиях отсутствия притока электронов с донорной стороны ФС2 [14, 15]. Таким образом, подобная форма КИФ указывает на отсутствие донирования электронов в ЭТЦ ФС2 со стороны КВК.

Форма КИФ частиц ФС2 в присутствии 2 мМ Tb^{3+} (кривая 3 на рис. 2) сходна с формой КИФ нативной ФС2 и существенно отличается от формы кривой препаратов ФС2 после экстракции из КВК ионов Mn. Как видно из рисунка, ионы тербия практически не оказывают влияния на участок О-Ж, участок Ж-Р также сохраняется, хотя характеризуется более медленным (примерно в 2 раза по сравнению с контролем) нарастанием интенсивности флуоресценции. Для количественной оценки выявленного эффекта КИФ аппроксимировали функцией $F(t) = F_0 + A_1(1 - \exp(-t/\tau_1)) + A_2(1 - \exp(-t/\tau_2))$, где F_0 – интенсивность флуоресценции при 50 мкс, а τ_1 и τ_2 – характерные времена фаз О-Ж и Ж-Р на индукционных кривых [12]. Время τ_1 для кривых нативных частиц ФС2 и частиц, обработанных тербием, различалось незначительно (1,5 мс и 1,3 мс, соответственно), в то время как время τ_2 в присутствии 2 мМ Tb^{3+} увеличивалось примерно в 2 раза по сравнению с контролем (272 мс и 558 мс, соответственно). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что электронный транспорт на акцепторной стороне ФС2 в присутствии тербия хотя и замедляется, но в значительной степени сохранен. Причиной замедления электронного транспорта от первичного на вторичный хинон при обработке ФС2 тербием может быть экстракция внешних белков КВК, что показано для обработки ФС2 другим лантаноидом – лантаном [9]. При удалении периферических белков с донорной стороны ФС2 сильно повышается окислительно-восстановительный потенциал Q_A , что приводит к замедлению переноса электрона на акцепторной стороне ФС2 [16]. Вывод о сохранении электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2 согласуется с полученными нами ранее результатами о слабом ингибировании тербием активности ФС2, оцениваемой по скорости восстановления искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндофенола [17]. В то же время, как было отмечено выше, ионы Tb^{3+} в значительной степени ингибируют выделение кислорода ФС2. Отсюда можно заключить, что в присутствии ионов тербия наблюдается «разобщение» электронного транспорта и выделения кис-

лорода частицами ФС2. Ранее подобный феномен значительного снижения скорости фотоиндуцированного выделения кислорода на фоне сохранения способности поставлять электроны в ЭТЦ был выявлен в препаратах ФС2, из которых были экстрагированы ионы Ca^{2+} путем обработки 2 М NaCl без использования хелаторов, а также в присутствии фторид-анионов, ацетата и аммония [18, 19]. Следует отметить, что максимальный уровень флуоресценции (Р) на КИФ в наших экспериментах достигался через 1 с после начала освещения, что соответствует литературным данным [20]. Этот уровень в препаратах ФС2 сохранялся как минимум в течение 10 с. Таким образом, это позволяет достаточно адекватно сопоставлять результаты измерения выхода флуоресценции и выделения O_2 .

На рис. 2 также приведены КИФ частиц ФС2 в присутствии 30 мМ Ca^{2+} и 2 мМ Tb^{3+} (кривая 4). В этом случае КИФ приближается по форме к КИФ нативной ФС2. Характерные времена фаз О-Ж и Ж-Р (τ_1 и τ_2) составляют в этом случае 1,4 мс и 291 мс. Этот результат показывает, что защитное действие кальция от влияния тербия проявляется здесь так же, как и в случае кислород-выделяющей активности ФС2. Следует отметить, что сами ионы Ca^{2+} в использованной нами концентрации 30 мМ не оказывают выраженного влияния на КИФ ФС2 ($\tau_1 = 1,3$ мс, $\tau_2 = 249$ мс).

При объяснении выявленного нами эффекта «разобщения» в присутствии Tb^{3+} встает вопрос об идентификации донора, поддерживающего электронный транспорт в ФС2 при ингибировании функции выделения кислорода. Природа окисляемого субстрата, восстанавливающего переносчики электронов на акцепторной стороне «разобщенных» препаратов ФС2, полученных экстракцией кальция из КВК, была подробно исследована в работе [21]. Эксперименты показали, что субстратом окисления, как и в случае нативной ФС2, является вода. Однако в «разобщенных» препаратах ФС2 происходит не полное окисление воды до молекулярного кислорода, а образование промежуточного продукта окисления – пероксида водорода. Если после обработки ФС2 ионами тербия происходит вытеснение Ca^{2+} из КВК, то результатом такого процесса будет появление «разобщенных» частиц ФС2. В соответствии с особенностями функционирования КВК в таких частицах, мы можем предположить, что субстратом окисления при обработке ФС2 ионами Tb^{3+} также является вода, которая окисляется не до O_2 , а до пероксида водорода [18, 21].

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N.* Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å // *Nature*. 2011. Vol. 473. N 7345. P. 55–60.
2. *Yocum C.F.* Calcium activation of photosynthetic water oxidation // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. Vol. 1059. N 1. P. 1–15.
3. *Shamsipur M., Pashabadi A.* Latest advances in PSII features and mechanism of water oxidation // *Coordin. Chem. Rev.* 2018. Vol. 374. P. 153–172.
4. *McEvoy J.P., Brudvig G.W.* Water-splitting chemistry of photosystem II // *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106. N 11. P. 4455–4483.
5. *Yocum C.F.* The calcium and chloride requirements of the O₂ evolving complex // *Coordin. Chem. Rev.* 2008. Vol. 252. N 3–4. P. 296–305.
6. *Wang L., Zhou Q., Huang X.* Photosynthetic responses to heavy metal terbium stress in horseradish leaves // *Chemosphere*. 2009. Vol. 77. N 7. P. 1019–1025.
7. *Ono T.* Effects of lanthanide substitution at Ca²⁺-site on the properties of the oxygen evolving center of photosystem II // *J. Inorg. Biochem.* 2000. Vol. 82. N 1–4. P. 85–91.
8. *Popovic R., Carpentier R., Morin L.* Determination of fluorescence inductions in a PSII submembrane fraction affected by additives // *J. Plant Physiol.* 1988. Vol. 132. N 6. P. 754–757.
9. *Ghanotakis D.F., Babcock G.T., Yocum C.F.* Structure of the oxygen-evolving complex of Photosystem II: calcium and lanthanum compete for sites on the oxidizing side of Photosystem II which control the binding of water-soluble polypeptides and regulate the activity of the manganese complex // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. Vol. 809. N 2. P. 173–180.
10. *Ghanotakis D.F., Babcock G.T., Yocum C.F.* Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 167. N 1. P. 127–130.
11. *Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E.* Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta*. 1989. Vol. 975. N 3. P. 384–394.
12. *Pospíšil P., Dau H.* Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution // *Photosynth. Res.* 2000. Vol. 65. N 1. P. 41–52.
13. *Strasser R.J., Govindjee.* On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Research in photosynthesis*. Vol. 2 / Ed. M. Murata. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1992. P. 29–32.
14. *Strasser B.J.* Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients // *Photosynth. Res.* 1997. Vol. 52. N 2. P. 147–155.
15. *Semin B.K., Seibert M.* Substituting Fe for two of the four Mn ions in photosystem II – effects on water-oxidation // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2016. Vol. 48. N 3. P. 227–240.
16. *Johnson G.N., Rutherford A.W., Krieger A.* A change in the midpoint potential of the quinone Q_A in photosystem II associated with photoactivation of oxygen evolution // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. Vol. 1229. N 2. P. 202–207.
17. *Локтюшкин А.В., Ловягина Е.Р., Семин Б.К.* Ингибирование электрон-транспортной цепи фотосистемы 2 катионами тербия // *Акт. вопр. биол. физ. хим.* 2018. Т. 3. № 2. С. 250–255.
18. *Semin B.K., Davletshina L.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M.* Decoupling of the processes of molecular oxygen synthesis and electron transport in Ca²⁺-depleted PSII membranes // *Photosynth. Res.* 2008. Vol. 98. N 1–3. P. 235–249.
19. *Lovyagina E.R., Semin B.K.* Mechanism of inhibition and decoupling of oxygen evolution from electron transfer in photosystem II by fluoride, ammonia and acetate // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2016. Vol. 158. P. 145–153.
20. *Pospíšil P., Dau H.* Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. Vol. 1554. N 1–2. P. 94–100.
21. *Semin K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M.* Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca²⁺-depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII // *Photosynth. Res.* 2013. Vol. 117. N 1–3. P. 385–399.

Поступила в редакцию 25.02.2019 г.
После доработки 19.04.2019 г.
Принята в печать 23.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

INTERACTION OF TERBIUM CATIONS WITH THE OXIDIZING SIDE OF PHOTOSYSTEM II HIGHER PLANTS

A.V. Loktyushkin*, E.R. Lovyagina, B.K. Semin

Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow 119234, Russia

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

Photosystem 2 (PSII) of the higher plants carries out the photoinduced oxidation of water and releases the molecular oxygen into atmosphere as a by-product of this reaction. The oxygen evolving complex (OEC) is located on the donor side of PSII and contains the Mn_4CaO_5 cluster catalyzing water oxidation. A cofactor of this reaction is Ca^{2+} cation. According to some physical and chemical properties (ionic radius, a coordination number) lanthanides ions are similar to Ca^{2+} ion parameters, and in the calcium binding proteins substitution of Ca^{2+} with these cations is possible. Some representatives of this cations group can bind to Ca-binding site in the OEC of PSII. In presented paper we investigated the interaction with the PSII donor side one of the least studied lanthanides – terbium. Results of our experiments showed that the incubation of native PSII preparations with Tb^{3+} cations lead to irreversible inhibition of oxygen evolving function ($\approx 75\%$ inhibition at 2 mM of Tb^{3+}). At the same time electron transport on the acceptor side of PSII substantially remains. Addition to incubation buffer 30 mM Ca^{2+} reduces the inhibition effect of terbium approximately twice. Obtained results well correspond to the data of measurements of fluorescence induction kinetic in PSII membranes in the presence of exogenous Ca^{2+} and Tb^{3+} and allow to assume that terbium cations displace Ca^{2+} from OEC. Calcium release induced by Tb^{3+} results to incomplete water oxidation producing H_2O_2 instead of molecular oxygen as it was shown for PSII without Ca^{2+} in OEC earlier.

Keywords: *photosystem II, oxygen-evolving complex, fluorescence induction kinetic, calcium, lanthanoides, terbium*

Сведения об авторах

Локтюшкин Алексей Владимирович – канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: *allokt@gmail.com*

Ловягина Елена Рудольфовна – канд. биол. наук, ст. научн. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: *elena.lovyagina@gmail.com*

Семин Борис Константинович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: *semin@biophys.msu.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 575:591.513.5

ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОГО ПРОГРЕВАНИЯ НА ПОВЕДЕНИЕ, НЕЙРОГЕНЕЗ ВЗРОСЛОГО МОЗГА И ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP-70 У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ**О.В. Перепелкина¹, Н.А. Огиенко¹, И.Г. Лильп¹, Д.Г. Гарбуз², А.В. Ревущин³,
Г.В. Павлова³, И.И. Полетаева^{1,*}**

¹*Кафедра высшей нервной деятельности, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*

²*Институт молекулярной биологии, Российская академия наук, Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32;*

³*Институт биологии гена, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5*

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

Мыши-самцы (гибриды F1 CBA x C57BL/6J) содержались в течение 1,5 ч при температуре 39,5°C. В тестах на когнитивные способности (решение элементарных логических задач – на способность к экстраполяции направления движения и на поиск входа в укрытие) мыши опытных групп (после воздействия повышенной температуры) решали задачу быстрее и эффективнее, а общая активность в тесте «малое открытое поле» (в отсутствие стрессогенной обстановки) и в тесте Порсолта (неизбегаемое плавание) была выше, чем у контрольных мышей. В отдельных экспериментах показано, что нагревание вызывает временное ухудшение нейрогенеза (т.е. уменьшение числа новых клеток по иммуногистохимическому маркеру Ki67) как в пролиферативной зоне гиппокампа (субгранулярный слой зубчатой фасции), так и в субвентрикулярной зоне переднего мозга. Прогревание также вызывало повышение экспрессии белка теплового шока HSP70 через 3 ч после воздействия, но через 24 ч отличий от контроля не было.

Ключевые слова: гипертермия, активация поведения, когнитивные способности, элементарная логическая задача, нейрогенез взрослого мозга, белки теплового шока, мыши-гибриды F1

Гипертермия (ГТ) – это спровоцированное внешними факторами накопление избыточного тепла в организме, вызывающее повышение температуры тела. В настоящее время последствия ГТ активно исследуют как состояние, при котором происходит усиление экспрессии так называемых белков теплового шока (Heat Shock Proteins, HSP). Разнообразные и многочисленные функции этой достаточно большой группы белков активно исследуются [1, 2]. Их экспрессия влияет на общий белковый обмен [3], на регуляцию клеточного цикла, на поддержание гомеостаза физиологических процессов [4], на формирование стресс-реакции [5, 6]. Отметим, что при анализе эффектов ГТ нагревание организма осуществляют в разных режимах [7]. Протекторные свойства ГТ, точнее – эффектов экспрессии HSP, описаны и для ЦНС [8–10], и для иммунной системы [1, 11].

Несмотря на сложную роль HSP в организме, ГТ, как потенциально полезное (протекторное)

воздействие, иногда используют преимущественно в онкологии, а также при разработке защиты от радиации [12], хотя прямых исследований этого вопроса немного [13–15]. В то же время мало информации о непосредственном влиянии однократного гипертермического воздействия на собственно поведение лабораторных грызунов – в частности, на выполнение ими тестов на когнитивные способности. Недавно было показано, что у крыс линии Крушинского-Молодкиной, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии, кратковременная (5 мин) ГТ в 14-дневном возрасте имеет небольшие по «размаху», но достоверные эффекты через 2 нед. после воздействия, которое снизило интенсивность судорог в ответ на звук, изменило «рисунок» привыкания к болевому стимулу и изменило показатели поведения в тесте приподнятого крестообразного лабиринта [16].

Таким образом, оценка изменений поведения животных, реакции мозговых систем нейрогенеза

и системы HSP в течение небольшого интервала времени (несколько суток) после однократного гипертермического воздействия представляется актуальной задачей. Получение новой информации по этому вопросу важно для решения ряда практических проблем, поскольку реакция системы HSP – важный компонент реакции организма на внешние воздействия, в том числе и на экстремальные. Целью настоящей работы было выявление изменений поведения мышей после однократной индуцированной прогреванием ГТ, (было проведено два эксперимента), а также изменений в уровне нейрогенеза взрослого мозга и экспрессии HSP-70 в мозге мышей (оценку производили в разные сроки после воздействия).

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Работа проведена на 4-месячных самцах-гибридах F1 мышей CBA x C57BL. Поведение оценивали у 11 мышей после ГТ и у 10 контрольных животных. В эксперименте по изучению нейрогенеза было использовано 13 животных (по 3 мыши спустя 24, 48 и 96 ч после ГТ, 4 – контроль без нагревания), в эксперименте по анализу экспрессии HSP-70 было 11 мышей (по 4 животных спустя 3 и 24 ч после ГТ, и 3 – контроль без нагревания).

Мышей содержали в пластиковых клетках (13x26,6x9,5 см) при естественной смене освещенности. Корм (Фирма «Чара», Сергиев Посад, Россия) и воду давали *ad libitum*. Эксперименты соответствовали биоэтическим требованиям Декларации ЕС-2010.

Условия создания ГТ. Прогревание осуществляли помещением мышей в термостат (39,5°C, 1,5 ч) с предварительной внутрибрюшинной инъекцией 1,5 мл физиологического раствора (для предотвращения обезвоживания) в клетку без подстилки. Во избежание гипоксии в термостат подавали воздух с помощью аквариумного компрессора, соединенного с длинной трубкой, обеспечивающей нагревание нагнетаемого воздуха. После индукции ГТ животных помещали в клетку с обычной подстилкой и содержали при комнатной температуре. Тестирование поведения начинали через 72 ч (в 1-й серии) или через 5 сут после сеанса ГТ (2-я серия).

Тестирование поведения. С животными были проведены 2 теста на когнитивные способности – на способность к экстраполяции (только с животными 2-й серии) и на поиск входа в укрытие. Их также тестировали в установке «малое открытое поле» и в тесте Порсолта.

Тест на способность к экстраполяции, разработанный Л.В. Крушинским [17] для оценки уровня элементарной рассудочной деятельности животных разных видов и адаптированный к ис-

следованию этой способности у мышей [18, 19], проводили в пластиковой камере (50x23x18 см). В центре нижней части передней стенки камеры было отверстие (1x1,2 см), через которое голодная мышь начинала пить молоко, но через 3–5 с после начала питья поилку отодвигали (с помощью стержня) вправо или влево, помещая ее перед одним из боковых отверстий. После исчезновения поилки из поля зрения мышь могла подойти к правому или левому боковым отверстиям. Правильным решением теста был подход к боковому отверстию, к которому передвинули поилку, неправильное решение теста – подход к противоположному отверстию. Успешность выполнения теста выражают в виде доли правильных решений группой животных с особым вниманием к результатам его первого предъявления, поскольку в этом случае у животного нет аналогичного опыта решения данного теста [17–19].

Тест на поиск входа в укрытие проводили в экспериментальной камере с 2 отсеками – темным (14x28x27,5 см) и ярко освещенным (30x28x27,5 см). Данный тест был предложен М. Голсуорси для оценки когнитивных способностей мышей и использовался как для сравнения эффектов нокаутов ряда генов, так и для изучения моделей психических заболеваний [20, 21]. Пребывание в ярко освещенном пространстве у мышей и крыс вызывает дискомфорт и стремление уйти в темноту. Между отсеками имеется «лаз» – углубленное в пол отверстие в нижней части стенки (4,5x1,5x11,5 см). В течение 2-дневного теста предъявляют 8 «проб» (1–4 – в первый день, 5–8 – во второй) [19]. В 1-й и 2-й пробах лаз открыт, и мышь может свободно перейти в темную часть камеры. С 3-й по 5-ю пробу лаз присыпают свежей стружкой вровень с полом, и, чтобы попасть в темную часть камеры, мышь должна «раскопать» стружку. На второй день пробу с присыпанным лазом повторяют один раз, а в следующих двух пробах лаз закрывают легкой «пробкой» (из картона и пластика), которая скрывает лаз, но достаточно легкая, чтобы мышь могла ее вытащить зубами или отодвинуть. В последней (8-й) пробе стружкой засыпают всю стенку между двумя частями камеры на высоту 5–7 см. В течение теста регистрируют время перехода в темное отделение, а для группы животных отмечают долю тех, кто решил последовательные пробы теста. Важно отметить, что решение тех проб теста, в которых вход в темную часть камеры «замаскирован», требует от животного «понимания», что ранее бывший видимым, но ныне скрытый объект (лаз) продолжает существовать, хотя он и невидим. Способность к решению такой задачи зависит от наличия у животного когнитивной способности, описанной Ж. Пиаже как свойство «неисчезаемости» [23]. Таким

образом, после первых двух предъявлений теста с открытым лазом решение следующих проб требовало проявления когнитивной способности.

Тест «малое открытое поле». В этом тесте (авторская модификация широко используемого теста «открытое поле», в котором используют большую арену – 1–1,5 м в диаметре и яркое освещение) оценивали соотношение проявлений тревожности и исследовательского поведения у животного после помещения его в новую обстановку, не вызывающую у мыши реакции испуга, как в стандартном тесте «открытое поле» с ярко освещенной ареной. В небольшой неярко освещенной круглой камере (диаметром 40 см, высота стенок – 25 см) в течение 3 мин регистрировали число вертикальных стоек, «норковых реакций» (заглядываний в отверстия в полу), а также число эпизодов чистки шерсти (груминга).

Тест Порсолта (неизбегаемое плавание) – широко используемый тест, позволяющий оценивать предрасположенность к развитию депрессии (время пребывания в воде в неподвижности – индикатор предрасположенности животного к депрессии [22]) проводили, помещая животное в воду, где оно либо плавает (активно или пассивно, т.е. слабо перебирая лапами), либо сохраняет полную неподвижность. Животных по одному помещали в сосуд с теплой водой (26°C) на 6 мин и регистрировали их поведение.

Пролиферативная активность в переднем мозге. Пролиферативную активность клеток субгранулярного слоя зубчатой фасции гиппокампа (FDH – Hippocampal Dentate Fascia, лат. *Fascia dentate hippocampi*) и субвентрикулярной зоны переднего мозга (SVZ – Subventricular Zone) оценивали с помощью иммуногистохимического окрашивания срезов с использованием антител к белку Ki-67, который экспрессируется в ядрах делящихся клеток. Через 24, 48 и 96 ч после нагревания проводили транскардиальную перфузию мозга с последующей процедурой изготовления срезов и окрашивания [24].

Вестерн-блот-анализ. Тотальные белковые экстракты гиппокампа выделяли при помощи набора ReadyPreptm Protein Extraction Kit (Total Protein) производства BioRad (США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для электрофореза образцы белка гомогенизировали в буфере состава: 65 мМ Трис-НСl (рН 6,8), глицерин (10%), додецилсульфат натрия (2%), β-меркаптоэтанол (4%), бромфеноловый синий (0,01%) с прогреванием при 100°C в течение 5 мин. Электрофорез проводили в 8%-ном полиакриламидном геле, как описано ранее [25]. После электрофореза проводили электроперенос белков из геля на мембрану Hybond ECL (GE Healthcare Bio-Sciences, США) при силе тока 1,5–2 мА/см²

в течение 1,5 ч полусухим методом в буфере состава: 25 мМ Трис-НСl, 0,2 М глицин, 20%-ный метанол, додецилсульфат натрия (0,01%). После переноса проводили забивку мембраны 3%-ным бычьим сывороточным альбумином (фракция V) в Трис-солевом буфере (20 мМ Трис-НСl, рН 7,6 и 0,14 М NaCl) в течение 1 ч для предупреждения неспецифической сорбции антител. После забивки мембрану инкубировали с первичными антителами (мышинные моноклональные антитела C92F3A-5, Abcam, Великобритания, к индуцируемой форме HSP-70) в разведении 1:1000 в течение 24 ч. Далее мембрану отмывали Трис-солевым буфером с Tween-20 (0,1%) 4 раза по 20 мин, после чего инкубировали с вторичными антителами к IgG мыши, меченными пероксидазой хрена, в течение 1 ч в разведении, рекомендованном производителем. Детектирование связавшихся антител проводили набором ECL (GE Healthcare Bio-Sciences, США) по инструкции производителя, уровень сигнала измеряли с помощью системы гель-документирования ChemiDoc MP и программы Quantity One 1-D Analysis Software (BioRad, США). Оптическую плотность полос измеряли с помощью программы ImageJ [26]. Для нормализации концентрации общего белка, нанесенного на гель, проводили перегибридизацию мембраны с антителами к актину (Clone C4, Millipore, США) аналогично обработке антителами к HSP-70 (рис. 3А).

Статистическая обработка данных. Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали с помощью однофакторного ANOVA с тестом Фишера «Least Significant Difference» (LSD) post hoc и непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистическая значимость различий альтернативных долей оценивалась с помощью метода φ (по Фишеру).

Результаты и обсуждение

В решении теста на экстраполяцию при его первом предъявлении различий между группами ГТ и контроль не было, а суммарно, по данным шести предъявлений теста, больше правильных решений было у мышей после ГТ (83,3% и 56,7%, различие достоверно, $p < 0,05$). Мыши группы ГТ выполняли тест (время подхода к боковому отверстию как при правильных, так и при неправильных решениях) недостоверно быстрее контрольных. Доли целенаправленных быстрых (<20 с) подходов к боковому отверстию были 44% и 30% соответственно (различия недостоверны, метод φ по Фишеру).

Время решения практически всех проб теста на поиск входа в укрытие в 1-й серии было короче у мышей после ГТ. Во 2-й серии (по 6 мышей в группах) различия во времени решения были ме-

нее четкими, чем в 1-й серии, но суммарно по двум сериям ГТ решение проб теста при «засыпанном» лазе происходило быстрее, чем в контроле (рис. 1А, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

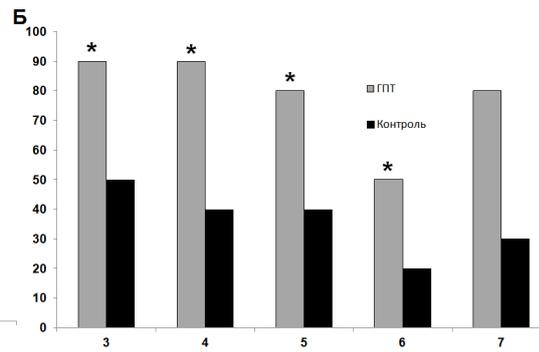
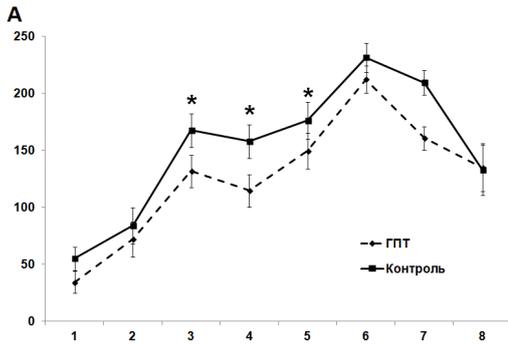


Рис. 1. Влияние однократного гипертермического воздействия на решение мышами когнитивных тестов. **А** – время (с, ось ординат) решения последовательных проб теста на поиск входа в укрытие мышами после ГТ (серая линия, $n=11$) и контрольными мышами (черная линия, $n=10$) суммарно для двух серий опытов (через 7 сут после гипертермического воздействия). По оси абсцисс – последовательные пробы теста. * – достоверно отличается от показателя контрольной группы ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни). **Б** – доли (% , ось ординат) мышей после ГТ и контрольных животных, решивших в тесте на поиск входа в укрытие его «когнитивные» пробы (пробы с 3 по 7). * – достоверно отличается от доли животных контрольной группы при $p < 0,05$ (метод ϕ – оценивающий различия альтернативных долей (по Фишеру).

Доли мышей, успешно решивших «когнитивные» этапы теста (т.е. те этапы, когда проникнуть в темную часть камеры можно было, только открыв замаскированный лаз), были выше у групп после ГТ, как была повышенной и активность ГТ-мышей в течение теста (стойки, подходы к лазу – эти данные не приводятся). Успешность решения «когнитивных» проб этого теста мышами двух групп показана на рис. 1Б.

В тесте «малое открытое поле» у мышей после ГТ было достоверно больше стоек ($34,2 \pm 3,6$ и $18,8 \pm 4,6$, $p < 0,05$), что свидетельствует о более высокой активности этих животных при исследовании новой обстановки.

В тесте Порсолта (неизбегаемое плавание) у мышей после ГТ число эпизодов активного и пассивного плавания было достоверно больше, чем у контрольных животных (4,6 и 3,0, $p < 0,05$ – для активного плавания; 9,8 и 5,2, $p < 0,05$ – для пассивного), т.е. мыши после ГТ меньше время сохраняли неподвижность.

Анализ нейрогенеза (подсчет новых клеток в двух пролиферативных зонах переднего мозга, рис. 2) показал значимое снижение числа клеток, меченных Ki67 через 24

и 48 ч после ГТ. Можно отметить, что в SVZ число пролиферирующих клеток восстановилось, по всей видимости, раньше, чем в FDH.

В целом, последствия однократного действия

повышенной температуры можно охарактеризовать как «активирующие», поскольку эти животные быстрее решали тест на экстраполяцию, более быстро и эффективно справлялись с «когнитивными» пробами в тесте на поиск входа в укрытие (что описано нами впервые), а также были более активны и в «малом открытом поле», и в тесте Порсолта. Малый размер экспериментальных групп в ряде случаев не позволяет говорить о достоверности межгрупповых различий показате-

лей ряда других тестов (например, теста «приподнятого крестообразного лабиринта» и тестов на новизну), поэтому эти данные в статье не приводятся.

Интенсивность пролиферации в зубчатой фасции гиппокампа взрослого мозга, которая, по нашим данным, была достоверно подавлена че-

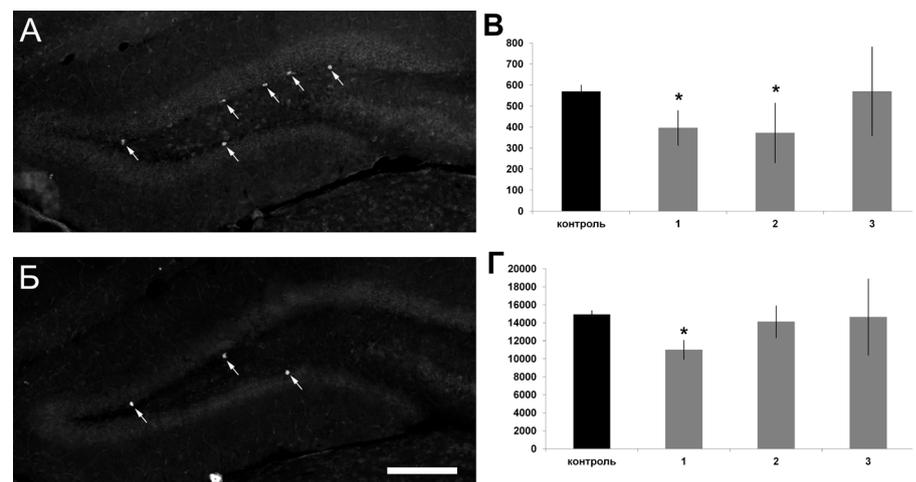


Рис. 2. Влияние однократного прогревания на уровень нейрогенеза в пролиферативных зонах переднего мозга. Микрофотографии срезов мозга мыши в зубчатой фасции гиппокампа (FDH) в контроле (А) и через 24 ч после температурного воздействия (Б). Масштаб – 100 мкм. **В** – число пролиферирующих клеток (маркер Ki67) в субгранулярном слое FDH, **Г** – то же в субвентрикулярном слое бокового желудочка (SVZ) мышей в контроле (черные столбики) и после ГТ (серые столбики) в сроки через 24, 48 и 96 ч (1, 2 и 3 на оси абсцисс, соответственно). * – достоверно отличается от показателя контрольной группы (однофакторный ANOVA с post hoc Least Significant Difference by Fisher).

рез 24 и 48 ч после ГТ, связана с проявлениями когнитивных способностей достаточно сложно [27], причем временные параметры развития этих эффектов обычно остаются неизвестными. Динамика экспрессии HSP-70 у мыш-ей-гибридов F1 (CBAxС5BL/6J) в условиях данного эксперимента (активация экспрессии через 3 ч после ГТ и снижение эффекта через 24 ч) очевидным образом опережает модуляцию нейрогенеза (рис. 3). Однако нельзя ожидать непосредственного влияния ГТ на генерацию новых клеток в пролиферативных зонах мозга через несколько часов после воздействия. В целом, связь между продукцией новых клеток в процессе нейрогенеза и пластичностью поведения может быть частично опосредована продукцией нейротрофинов, в частности, BDNF (Brain Derived Neurotropic Factor) [28, 29], и модулирующими влияниями ГТ на глутаматергическую систему [30]. Отсутствие четкой информации о времени развития процессов активации HSP-70 и нейрогенеза затрудняет однозначную интерпретацию данных по эффектам ГТ, описанных в настоящей статье.

Рис. 3. Анализ содержания HSP-70 в мозге мыш-ей после краткого гипертермического воздействия. **А** – результат вестерн-блот анализа содержания HSP-70 в гиппокампе мыш-ей в контроле (1–3), через 24 ч (4–7) и через 3 ч (8–11) после 90-минутного нагревания до 39,5°C. **Б** – количественный анализ оптической плотности (ось ординат) линий форе-за (среднее ± ошибка среднего). Черный столбик – контроль, серые столбики – группы с ГТ (1 – через 3 ч, 2 – через 24 ч после воздействия). * – достоверно отличается от показателя контрольной группы ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Имеющаяся сегодня информация о влиянии ГТ посвящена преимущественно анализу отдаленных последствий ГТ, которой подвергали организм в раннем постнатальном онтогенезе [31]. В то же время практически отсутствует информация о прямом влиянии ГТ на собственно поведение (в частности, лабораторных грызунов). Из существующих сегодня данных не ясно, является ли ослабление нейрогенеза реакцией на ГТ (и индукцию HSP-70) или это процессы, протекающие парал-

лельно. Очевидно на важность подобного явления, оно нуждается в более подробном исследовании. Однако, несмотря на небольшое число животных в каждой из серий, обнаруженные в этих экспериментах эффекты ГТ позволяют говорить об эффективности такого воздействия в

аспекте активации адаптивных реакций животного. Это особенно очевидно по результатам теста на поиск входа в укрытие, который мыши после ГТ решали не только быстрее, но и более успешно. Эффект усиления когнитивных способностей животных после ГТ, описанный в настоящей статье, обнаружен впервые. Это может быть важным для дальнейшего исследования молекулярно-генетических основ реакции животного на экстремальные воздействия.

В заключение следует отметить, что кратковременное (1,5 ч) однократное нагревание (39,5°C) изменило выполнение мыш-ями-гибридами (F1 CBA x C57BL/6J) когнитивных тестов, а также активировало поведение животных в целом. Через 24 ч после воздействия повышенной температуры в субгранулярной области гиппокампа и в субвентрикулярной зоне переднего мозга было отмечено достоверное снижение числа делящихся клеток, а экспрессия белка теплового шока HSP-70 была достоверно повышена по сравнению с контролем через 3 ч после ГТ, но не через 24 ч.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-29-01001), а также в рамках темы госрегистрации «АААА-А16-116021660055-1».

Эксперименты с животными осуществлялись в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В. Молекулярные, клеточные и протективные функции белка теплового шока 70 кДа // *Нейронауки*. 2005. Т.2. № 2. С. 3–25.
2. De Maio A. Extracellular HSP70: export and

function // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2014. Vol. 15. N 3. P. 225–231.

3. Bozaykut P., Ozer N.K., Karademir B. Regulation of protein turnover by heat shock proteins // *Free*

Radic. Biol. Med. 2014. Vol. 77. P. 195–209.

4. Ren M., Leng Y., Jeong M., Leeds P.R., Chuang D.M. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction // J. Neurochem. 2004. Vol. 89. N 6. P. 1358–1367.

5. Santoro M.G. Heat shock factors and the control of the stress response // Biochem. Pharmacol. 2000. Vol. 59. N 1. P. 55–63.

6. Zlatković J., Bernardi R.E., Filipović D. Protective effect of Hsp70i against chronic social isolation stress in the rat hippocampus // J. Neural. Transm. (Vienna). 2014. Vol. 121. N 1. P. 3–14.

7. Duhan V., Joshi N., Nagarajan P., Upadhyay P. Protocol for long duration whole body hyperthermia in mice // J. Vis. Exp. 2012. Vol. 25. N 66: e3801.

8. Bobkova N., Guzhova I., Margulis B., Nesterova I., Medvedinskaya N., Samokhin A., Alexandrova I., Garbuz D., Nudler E., Evgen'ev M. Dynamics of endogenous HSP70 synthesis in the brain of olfactory bulbectomized mice // Cell Stress Chaperon. 2013. Vol. 18. N 1. P. 109–118.

9. Evgen'ev M.B., Krasnov G.S., Nesterova I.V., Garbuz D.G., Karpov V.L., Morozov A.V., Snezhkina A.V., Samokhin A.N., Sergeev A., Kulikov A.M., Bobkova N.V. Molecular mechanisms underlying neuroprotective effect of intranasal administration of human hsp70 in mouse model of Alzheimer's disease // J. Alzheimers. Dis. 2017. Vol. 59. N 4. P. 1415–1426.

10. Chen S., Brown I.R. Neuronal expression of constitutive heat shock proteins: implications for neurodegenerative diseases // Cell Stress Chaperon. 2007. Vol. 12. N 1. P. 51–58.

11. Zhu C., Wu Y., Chen S., Yu M., Zeng Y., You X., Xiao J., Wang S. Protective immune responses in mice induced by intramuscular and intranasal immunization with a *Mycoplasma pneumoniae* P1C DNA vaccine // Can. J. Microbiol. 2012. Vol. 58. N 5. P. 644–652.

12. Wang Y.S., Liu S.J., Huang S.C., Chang C.C., Huang Y.C., Fong W.L., Chi M.S., Chi K.H. Recombinant heat shock protein 70 in combination with radiotherapy as a source of tumor antigens to improve dendritic cell immunotherapy // Front. Oncol. 2012. Vol. 2: 149.

12. Ohnishi K., Matsumoto H., Takahashi A., Wang X., Ohnishi T. Heat shock transcription factor, HSF, is activated by ultraviolet irradiation // Photochem. Photobiol. 1996. Vol. 64. N 6. P. 949–952.

13. Liu F.F., Miller N., Levin W., Zanke B., Cooper B., Henry M., Sherar M.D., Pintilie M., Hunt J.W., Hill R.P. The potential role of HSP70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer // Int. J. Hyperthermia. 1996. Vol. 12. N 2. P. 197–208.

14. Lee H.J., Lee Y.J., Kwon H.C., Bae S., Kim S.H.,

Min J.J., Cho C.K., Lee Y.S. Radioprotective effect of heat shock protein 25 on submandibular glands of rats // Am. J. Pathol. 2006. Vol. 169. N. 5. P. 1601–1607.

15. Schildkopf P., Frey B., Ott O.J., Rubner Y., Multhoff G., Sauer R., Fietkau R., Gaigl U.S. Radiation combined with hyperthermia induces HSP70-dependent maturation of dendritic cells and release of pro-inflammatory cytokines by dendritic cells and macrophages // Radiother. Oncol. 2011. Vol. 101. N 1. P. 109–115.

16. Fedotova I.B., Nikolaev G.M., Kostyna Z.A., Poletaeva I.I. Remote effects of short-term neonatal hyperthermia in Krushinsky-Molodkina rats prone to audiogenic seizures strain // Dokl. Biol. Sci. 2017. Vol. 472. N 1. P. 1–3.

17. Крушинский Л.В. Биологические основы рас-судочной деятельности / М.: Изд. МГУ, 1977. 272 с.

18. Poletaeva I.I., Popova N.V., Romanova L.G. Genetic aspects of animal reasoning // Behav. Genet. 1993. Vol. 23. N 5. P. 467–475.

19. Perepelkina O.V., Golibrodo V.A., Lilp I.G., Poletaeva I.I. Selection of mice for high scores of elementary logical task solution // Dokl. Biol. Sci. 2015. Vol. 460. N 1. P. 52–56.

20. Galsworthy M.J., Paya-Cano J.L., Liu L., Monleón S., Gregoryan G., Fernandes C., Schalkwyk L.C., Plomin R. Assessing reliability, heritability and general cognitive ability in a battery of cognitive tasks for laboratory mice // Behav. Genet. 2005. Vol. 35. N 5. P. 675–692.

21. Ben Abdallah N.M.-B., Fuss J., Trusel M., Galsworthy M.J., Bobsin K., Colacicco G., Deacon R.M., Riva M.A., Kellendonk C., Sprengel R., Lipp H.P., Gass P. The puzzle box as a simple and efficient behavioral test for exploring impairments of general cognition and executive functions in mouse models of schizophrenia // Exp. Neurol. 2011. Vol. 227. N 1. P. 42–52.

22. Porsolt R.D. Animal model of depression // Biomedicine. 1979. Vol. 30. N 3. P. 139–140.

23. Zucca P., Milos N., Vallortigara G. Piagetian object permanence and its development in Eurasian jays (*Garrulus glandarius*) // Anim. Cogn. 2007. Vol. 10. N 2. P. 243–258.

24. Timoshenko T.V., Perepelkina O.V., Markina N.V., Revischin A.V., Pavlova G.V., Poletaeva I.I., Sukhih G.T. Audiogenic epilepsy in mice with different genotypes after neonatal treatments enhancing neurogenesis in dentate gyrus // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. Vol. 147. N 4. P. 458–461.

25. Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis // J. Biol. Chem. 1977. Vol. 252. N 3. P. 1102–1106.

26. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W.

NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9. N 7. P. 671–675.

27. Lipp H.-P. Evolutionary shaping of adult hippocampal neurogenesis in mammals—cognitive gain or developmental priming of personality traits? // Front. Neurosci. 2017. Vol. 11: 420.

28. Vilar M., Mira H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles // Front Neurosci. 2016. Vol. 10: 26.

29. Rossi C., Angelucci A., Costantin L., Braschi C., Mazzantini M., Babbini F., Fabbri M.E., Tessarollo L., Maffei L., Berardi N., Caleo M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment // Eur. J. Neurosci. 2006.

Vol. 24. N 7. P. 1850–1856.

30. Hashimoto K., Tomitaka S., Bi Y., Narita N., Minabe Y., Iyo M. Rolipram, a selective phosphodiesterase type-IV inhibitor, prevents induction of heat shock protein HSP-70 and hsp-70 mRNA in rat retrosplenial cortex by the NMDA receptor antagonist dizocilpine // Eur. J. Neurosci. 1997. Vol. 9. N 9. P. 1891–1901.

31. Wetsel W.C. Hyperthermic effects on behavior // Int. J. Hyperthermia. 2011. Vol. 7. N 4. P. 353–373.

Поступила в редакцию 01.12.2018 г.

После доработки 15.04.2019 г.

Принята в печать 23.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE EFFECT OF A SINGLE HEATING TREATMENT ON LABORATORY MICE BEHAVIOUR, ADULT NEUROGENESIS AND THE EXPRESSION OF HEATSHOCK PROTEIN HSP70

O.V. Perepelkina¹, N.A. Ogienko¹, I.G. Lilp¹, D.G. Garbuz², A.V. Revishchin³,
G.V. Pavlova³, I.I. Poletaeva^{1,*}

¹Department of Higher Nervous Activity, School of Biology, Lomonossov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova str. 32, Moscow, 119991, Russia;

³Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova str., 34/5, Moscow, 119334, Russia
*e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Male hybrid mice (F1 CBA x C57BL/6J) were kept for 1.5 h at the temperature 39,5°C. In cognitive tests (extrapolation and puzzle-box elementary logic task solution) mice of experimental groups (after being kept in elevated temperature environment) solved the tasks more quickly and more successfully, while their activity the «small open field» (in which no stress-inducing stimuli were present) and in Porsolt test (unescapable swimming) was higher than in control mice. tests they were also more active. In separate experiments the temporary impairment in the adult neurogenesis (the decrease of new cells numbers detected immuno-histochemically by the marker Ki67) after elevated temperature exposure was demonstrated in both subgranular area of dentate fascia and in subventricular proliferative zone of the forebrain. The heating treatment was accompanied by the increase of HSP70 expression at the time point 3 h after the treatment but which was not different from the controls after 24 h.

Keywords: hyperthermia, behavioral activation, cognitive ability, elementary logic task, adult neurogenesis, heat shock proteins, hybrid F1 mice

Сведения об авторах

Перепелкина Ольга Викторовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-68; e-mail: o_perepel73@mail.ru

Огиенко Надежда Александровна — аспирант кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-68; e-mail: esperanzao@mail.ru

Лильп Ирина Германовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры высшей нервной дея-

тельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-68; e-mail: lilp@mail.ru

Гарбуз Давид Григорьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института молекулярной биологии РАН. Тел.: 8-499-135-23-11; e-mail: dgarbuz@yandex.ru

Ревещин Александр Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена. Тел.: 8-499-135-25-41; e-mail: revishchin@mail.ru

Павлова Галина Валериевна — докт. биол. наук, зав. лабораторией нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН. Тел.: 8-499-135-25-41; e-mail: lkorochkin@mail.ru

Полетаева Инга Игоревна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-68; e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.112.1

СУПРАВЕНТРИКУЛЯРНЫЙ МИОКАРД СЕРДЦА МЫШЕЙ В6СВАF1 ПРОЯВЛЯЕТ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННУЮ АРИТМОГЕННОСТЬ БЛАГОДАря ЭКТОПИЧЕСКОЙ АВТОМАТИИ И ТРИГГЕРНОЙ АКТИВНОСТИ**В.М. Потехина^{1,*}, О.А. Аверина², В.С. Кузьмин^{1,3}**

¹*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12;*

²*НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 40;*

³*Кафедра физиологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.*

*e-mail: vm-potekhina@yandex.ru

Значительное количество исследований направлено на изучение механизмов возникновения и способов предотвращения суправентрикулярных аритмий – в частности, фибрилляции предсердий. Ее возникновение в большинстве случаев связывают с особенностями электрофизиологии миокардиальной ткани легочных вен (ЛВ), наиболее важной из которых является склонность этой ткани к формированию эктопической автоматии. Однако к настоящему моменту отсутствуют сведения о существовании линий мышей, генетически предрасположенных к аритмиям благодаря эктопии в суправентрикулярном миокарде. Тем не менее, грызуны становятся все более частым модельным объектом для фундаментальных исследований в области электрофизиологии. В связи с вышесказанным, цель настоящей работы заключалась в исследовании биоэлектрических характеристик миокарда ЛВ и предсердий, а также в выявлении особенностей электрической активности сердца у мышей поколения F1 межлинейных гибридов линий C57Bl/6 и CBA (B6CBAF1). В экспериментах *ex vivo* регистрировали потенциалы действия (ПД) в тканевых препаратах предсердного миокарда и миокарде ЛВ мышей B6CBAF1, а также у мышей наиболее часто используемой линии – BALB/c – с помощью стандартной микроэлектродной техники. В экспериментах *in vivo* у мышей B6CBAF1 и BALB/c регистрировали и рассчитывали стандартные параметры электрокардиограммы (ЭКГ). В 80% экспериментов в миокарде ЛВ у мышей B6CBAF1 наблюдалась перманентная эктопическая автоматическая активность. Спонтанные ПД (СПД) в 55% случаев характеризовались осцилляциями мембранного потенциала в ходе реполяризации, благодаря чему длительность ПД достигала 1–20 с. СПД у мышей B6CBAF1 наблюдались не только в ЛВ, но и в миокарде левого предсердия в 80% экспериментов. У мышей BALB/c, в отличие от B6CBAF1, длительных эпизодов СПД, аномалий реполяризации ПД не наблюдали ни в одном из экспериментов ни в ЛВ, ни в предсердном миокарде. При регистрации ЭКГ у мышей B6CBAF1, как и у BALB/c, не было выявлено нарушений ритма, а также значимых отклонений основных параметров ЭКГ, за исключением повышенной частоты сердечных сокращений. Возможно, что мыши B6CBAF1 являются первым обнаруженным межлинейным гибридом, суправентрикулярный миокард которых предрасположен к аритмогенной автоматии за счет эктопической и триггерной активности.

Ключевые слова: C57Bl/6, CBA, сердце, легочные вены, фибрилляция предсердий, эктопическая активность, триггерная активность, ранние постдеполяризации, аритмия

Фибрилляция предсердий (ФП), представляющая собой один из типов суправентрикулярной тахикардии, является наиболее распространенной формой нарушения ритма сердца. ФП явля-

ется мультиэтиологическим заболеванием, однако в ее основе всегда лежат электрофизиологические механизмы [1], одним из которых является эктопическая автоматия (эктопическая активность,

фокальная активность), связанная со способностью внепейсмерных участков миокарда спонтанно генерировать внеочередные потенциалы действия (ПД). В свою очередь, эктопическая автоматия у млекопитающих и человека обусловлена целым рядом биоэлектрических явлений, среди которых выделяют постдеполяризации — нарушение реполяризации потенциалов действия (ПД) [2, 3]. Один из механизмов возникновения ФП связан с распространением фокального возбуждения из легочных вен (ЛВ) в ткань миокарда левого предсердия (ЛП).

В настоящее время показано, что источником эктопической автоматии и ФП в большинстве случаев является миокардиальная ткань ЛВ или так называемые «миокардиальные рукава»/«обкладка ЛВ». Известно, что миокардиальная ткань не только формирует стенки сердца, но также выходит за пределы его камер — обнаруживается в стенке торакальных вен, к которым относятся и ЛВ [4]. У человека миокард ЛВ проявляет аритмогенные свойства за счет особенностей строения, эмбрионального происхождения и биоэлектрических характеристик кардиомиоцитов. Вместе с тем, миокардиальная ткань ЛВ обладает и рядом типичных для предсердного миокарда биоэлектрических свойств [5].

Миокардиальные рукава ЛВ имеют разную протяженность у различных млекопитающих и человека. У грызунов, таких как крысы или мыши, миокардиальная ткань в ЛВ развита достаточно хорошо: она не только выстилает внелегочные участки стенок вен, но также обнаруживается во внутрилегочных участках [6]. Миокард ЛВ грызунов функционально связан с предсердиями и образован несколькими слоями кардиомиоцитов. Такие свойства миокарда ЛВ грызунов делают эту ткань хорошим модельным объектом для экспериментальных работ, связанных с ФП. Известно, что именно мыши наиболее часто используются в электрофизиологических исследованиях благодаря возможности получения нокаутных и генетически модифицированных животных. Однако, в отличие от крупных животных, у грызунов для миокарда ЛВ характерна низкая «аритмогенность»: эктопическая, или триггерная, активность у них не наблюдается в нормальных условиях.

Таким образом, выявление линии мышей, для миокарда предсердий или ЛВ которых характерна эктопическая проаритмическая активность, будет способствовать пониманию фундаментальных аспектов развития ФП и изучению способов предотвращения аритмии. Цель данной работы заключается в исследовании электрофизиологических характеристик миокардиальной ткани ЛВ и левого предсердия мышей гибридной линии B6CBAF1, как потенциальной генетически обу-

словленной модели грызунов, обладающих суправентрикулярным миокардом, предрасположенным к аритмиям.

Материалы и методы

Использовали взрослых самцов первого поколения (F1) межлинейных гибридов мышей (B6CBAF1, 25–30 г), полученных в результате скрещивания инбредных линий C57Bl/6NCrl (самцы, «B6») и CBA/CaClr (самки, «CBA»). Мыши родительских линий были получены из генетически контролируемых популяций питомников Charles River Laboratories (США). Также в качестве контрольных животных использовали белых мышей инбредной линии BALB/c. В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными. Всех животных перед экспериментом 2 нед. содержали в виварии в стандартных условиях, при 12-ти часовом световом дне с доступом к воде и пище *ad libitum*.

В *ex vivo* экспериментах по регистрации потенциала покоя (ПП) и ПД использовали изолированные многоклеточные препараты, включающие участки миокардиальной ткани ЛВ, а также многоклеточные препараты ЛП. В данных экспериментах было использовано 62 животных (36 — B6CBAF1, 26 — BALB/c).

Эксперименты выполнены с помощью стандартной микроэлектродной техники, подробно описанной ранее [7]. Для регистрации ПП и ПД использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивлением 15–30 МОм), подключенные к усилителю (А-М system 1600, США). Усиленный сигнал поступал на АЦП (Е-154; L-Card, Россия) и далее на компьютер для записи. Запись и анализ сигнала осуществляли с помощью программы «Power Graph 3.3» (Ди-софт, Россия). ПП и ПД регистрировали с «эндокардиальной» стороны препаратов после получасового периода адаптации. В течение периода адаптации, а также частично в ходе эксперимента препараты работали в навязанном ритме (частота 5 Гц, длительность импульса — 2 мс, амплитуда — 3–10 В). Тканевые миокардиальные препараты перфузировали при 37°C оксигенированным (O₂ — 95%, CO₂ — 5%) раствором Тирода (состав, мМ: NaCl — 129, KCl — 4, NaH₂PO₄ — 20,9, MgSO₄ — 0,5, NaHCO₃ — 20, CaCl₂ — 1,2, глюкоза — 5, pH 7,2–7,4) со скоростью потока 10 мл/мин. Оценивали уровень ПП и длительность ПД на уровне 90% и 50% реполяризации (ДПД90% и ДПД50%, соответственно) с помощью программ Power Graph 3.3 и MiniAnalysis 6.0.7. (Synaptosoft, США).

В экспериментах *in vivo* регистрировали ЭКГ (всего использовано 15 мышей, из них — 8 B6CBAF1, 7 — BALB/c). Животных наркотизиро-

вали раствором уретана (1 г/кг, интраперитонеально). После достижения должной анестезии животное фиксировали на хирургическом столике; температуру тела поддерживали принудительно (термоконтроллер bio-tc1; НПФ «Биотехнологии», Россия). ЭКГ регистрировали с помощью поверхностных электродов, подключенных к усилителю PL3516 PowerLab 16/35, Animal Bio Amp (ADInstruments, США) в отведении, эквивалентном II отведению по Эйнтховену. Запись и анализ сигнала осуществляли при помощи программного обеспечения LabChart Pro (ADInstruments, США).

При анализе ЭКГ оценивали следующие параметры: ЧСС (частота сердечных сокращений, ударов в минуту – уд./мин, рассчитывали на основе длительности RR-интервалов); интервал PR (мс), соответствующий общему времени атрио-вентрикулярного проведения; QRS (мс) – время, деполяризации желудочкового миокарда; интервал QT (мс), соответствующий продолжительности деполяризации желудочкового миокарда (QT оценивали в соответствии с рекомендациями Boukens [8]). Также оценивали наличие или отсутствие нарушений ритма.

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением апостериорных тестов для множественных сравнений в группах с независимыми измерениями (с внесением поправки Даннета после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Вилка). Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение за исключением репрезентативных записей.

Результаты и обсуждение

В экспериментах регистрировали (1) ПД, возникающие при ритмической стимуляции тканевых препаратов возбуждающими стимулами, т.е. «электрически-вызванные» ПД, а также (2) биоэлектрическую активность (спонтанные ПД – СПД) в отсутствие электрической стимуляции. В обоих случаях регистрировали и оценивали ПП. Указанные два режима работы тканевых препара-

тов моделируют (1) «естественные» условия, когда ткань находится под ритмическим контролем ритмоводителя, а также (2) «патологические» условия, когда возбуждение ткани импульсами ритмоводителя заблокировано. В тех условиях, когда электрическая стимуляция отсутствует, возникно-

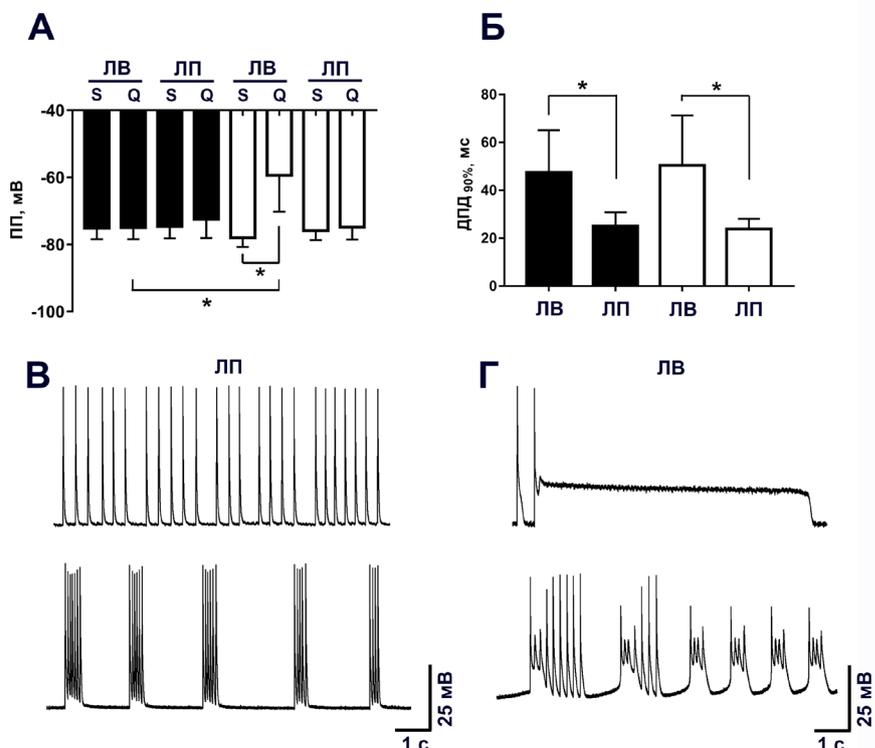


Рис. 1. Особенности биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен (ЛВ) и левого предсердия (ЛП) мышей В6СВАF1 в сравнении с мышами BALB/c. А. Значения потенциала покоя (ПП) в стимулируемых (S – stimulated) и нестимулируемых («покоящихся», Q – quiescent) препаратах миокардиальной ткани ЛВ и миокарда ЛП у мышей В6СВАF1 (черные столбики) и мышей BALB/c (белые столбики). * – $p < 0,05$. Б. Длительность потенциала действия на уровне 90% реполяризации (ДПД_{90%}) в препаратах ЛВ и ЛП у мышей В6СВАF1 (черные столбики) и BALB/c (белые столбики). * – $p < 0,05$. В. Репрезентативные примеры автоматической активности в препаратах миокарда ЛП у мышей линии В6СВАF1. Г. Репрезентативные примеры автоматической активности с ранними постдеполяризациями (сверху) и с триггерной активностью (снизу) в препаратах миокарда ЛВ у мышей линии В6СВАF1.

вание проаритмической активности гораздо более вероятно.

При ритмической электрической стимуляции в миокарде ЛВ и ЛП у мышей В6СВАF1 наблюдали ПД, типичные для рабочего предсердного миокарда. В миокарде ЛВ мышей В6СВАF1 ДПД_{90%} составила 48 ± 17 мс, а ДПД_{50%} 9 ± 1 мс ($n=8$). Значения длительности ПД статистически не отличались от аналогичных показателей у мышей линии BALB/c, где ДПД_{90%} составила 50 ± 20 мс, а ДПД_{50%} – 13 ± 4 мс ($n=5$, рис. 1 Б). В предсердном миокарде у мышей В6СВАF1 ДПД_{90%} была статистически значимо меньше, чем в препаратах ЛВ и составила 25 ± 5 мс, а ДПД_{50%} 7 ± 2 мс ($n=7$). У мышей BALB/c ДПД_{90%} в ЛП составила 24 ± 4 мс, а

ДПД_{50%} 6 ± 1 мс ($n=5$, рис. 1Б). Статистически значимых различий в значениях длительности электрически вызванных ПД как в миокарде ЛВ, так и в предсердном миокарде у мышей двух линий обнаружено не было. Таким образом, в условиях ритмической электрической стимуляции миокард ЛВ и предсердий гибридов В6СВАF1 демонстрировал типичную биоэлектрическую активность, сходную с таковой у мышей других линий.

У мышей BALB/c в электрически стимулируемых препаратах ЛВ ПП составил -78 ± 3 мВ ($n=9$), а в покоящихся препаратах ЛВ происходил сдвиг ПП, в результате которого значения ПП устанавливались на новом уровне: -59 ± 10 мВ ($n=5$). Сдвиг ПП в ЛВ является типичным свойством ЛВ и описан у целого ряда лабораторных животных: крыс [3], мышей других линий [9]. Уровни ПП, регистрируемые при стимуляции и в ее отсутствии в ЛВ, различаются статистически значимо ($p < 0,05$, рис. 1А).

ПП в электрически стимулируемых препаратах ЛВ мышей В6СВАF1 составлял -75 ± 3 мВ ($n=14$), что сопоставимо со значением у мышей BALB/c. ПП оставался на таком же уровне и тогда, когда ритмическая стимуляция отсутствовала (-74 ± 4 мВ, $n=14$, рис. 1А). Таким образом, сдвиг ПП в ЛВ у гибридов В6СВАF1 отсутствовал. Такая особенность миокардиальной ткани ЛВ выявлена впервые.

ПП был одинаков в стимулируемых и покоящихся препаратах ЛП гибридов В6СВАF1: -74 ± 4 мВ ($n=10$) и -72 ± 5 мВ ($n=9$), соответственно. У мышей линии BALB/c в стимулируемом предсердном миокарде ПП в наших экспериментах составил -76 ± 3 мВ, а в нестимулируемом -75 ± 4 мВ ($n=6$ в обоих случаях, рис. 1А). Значения ПП в предсердном миокарде мышей В6СВАF1 и BALB/c статистически не различались. Стабильный уровень ПП характерен для предсердного миокарда, в отличие от миокарда ЛВ, практически для всех млекопитающих и гибриды В6СВАF1 не оказались исключением в этом аспекте.

Несмотря на сходство биоэлектрической активности в условиях ритмической стимуляции тканевых препаратов гибридов В6СВАF1 и мышей контрольной линии BALB/c, нами были обнаружены существенные различия в условиях отсутствия стимуляции.

В 80% (в 15 из 19) тканевых препаратов ЛВ мышей В6СВАF1 наблюдали спонтанную (автоматическую) внеузловую (эктопическую) активность: в течение 10–60 с после прекращения стимуляции в ЛВ возникали СПД, при этом ПП оставался на постоянном уровне. Спонтанная активность имела перманентный (сохранялась на протяжении всего периода регистрации) и регулярный характер. В 55% (в 8 из 15) таких пре-

паратов реполяризация СПД сопровождалась повторяющимися длительными осцилляциями мембранного потенциала (рис. 1В). Наблюдаемые у В6СВАF1 осцилляции имеют характерный вид т.н. «триггерной активности», служащей одним из механизмов ФП [10, 11]. Длительность ПД за счет таких осцилляций была крайне увеличена и могла достигать 20 с, что значительно превышает нормальную длительность ПД (рис. 1В). В миокарде ЛВ мышей BALB/c никогда не наблюдали перманентной спонтанной активности и только в 20% (в 3 из 15) случаев единичные СПД возникали в ходе периода стабилизации ПП (5–15 с) при изменении режима стимуляции. Также в ЛВ мышей BALB/c не наблюдали осцилляций мембранного потенциала в ходе реполяризации ПД.

Как и в ЛВ, в предсердном миокарде мышей В6СВАF1 наблюдали спонтанную активность, которая имела перманентный, регулярный или периодический характер и возникала в 80% экспериментов (в 13 из 17). СПД в предсердном миокарде возникали либо сразу, либо в течение первых 60 с после прекращения стимуляции. В отличие от ЛВ, в предсердном миокарде СПД не характеризовались осцилляциями мембранного потенциала в ходе реполяризации. У мышей линии BALB/c не наблюдали спонтанной активности ни в одном из препаратов предсердного миокарда ($n=7$). Согласно данным литературы, спонтанная активность в нормальных условиях не характерна для рабочего миокарда предсердий грызунов и более крупных животных [3, 12, 13]. Также, согласно нашим предварительным данным, спонтанная автоматия не является характерной для суправентрикулярного миокарда мышей родительских линий C57Bl/6 и CBA.

Таким образом, нами впервые показано, что миокард ЛВ и предсердий гибридов В6СВАF1 в отличие от мышей BALB/c склонен к эктопической автоматии и/или нарушениям реполяризации ПД триггерного характера, служащим обычно основой формирования ФП у крупных млекопитающих и человека. Согласно нашим представлениям и данным литературы, спонтанная активность и аномалии реполяризации ПД в нормальных условиях (то есть без адренергической/симпатической стимуляции) ранее не были показаны ни для одной из линий мышей, и, более того, линии грызунов. Возможно, миокардиальная ткань ЛВ гибридов В6СВАF1 может рассматриваться как генетически обусловленная «естественная» модель проаритмического миокарда.

Причины эктопической автоматии и триггерной активности в миокарде ЛВ и предсердий гибридов В6СВАF1 остаются не до конца понятными. В настоящее время разведение гибридов линий C57Bl/6 и CBA осуществляет несколько

компаний. Гибриды B6CBAF1 используются в ряде биомедицинских исследований и, в частности, служат для получения Стг-зависимых тканеспецифических нокаутов [14]. Тем не менее, фенотип и особенности физиологии, в том числе электрофизиологии сердца мышей данной линии описаны слабо. Известно, что самки B6CBAF1 от-

С другой стороны, увеличение длительности ПД и появление аритмогенной триггерной активности может быть связано со снижением экспрессии каналов, переносящих реполяризующие калиевые токи, которыми у грызунов являются I_{ss} , I_{to} , I_{Kur} [20, 21]. Предположение о сниженном уровне I_{ss} , I_{to} или I_{Kur} у B6CBAF1 требует дополнительных экспериментов.

Большинство аномалий биоэлектрической активности приводят к изменению ЭКГ. В наших экспериментах ЭКГ гибридов B6CBAF1 не имела ярко выраженных изменений: как и у мышей BALB/c на ЭКГ были видны зубец P, QRS-комплекс и T-волна (рис. 2Б). У мышей B6CBAF1 ЧСС в наших экспериментах составляла 596 ± 42 уд./мин, длительность PR-интервала – $34,3 \pm 2$ мс, длительность зубца P – $14,9 \pm 2$ мс, длительность QRS-комплекса $9,2 \pm 2$ мс, а длительность QT интервала – $46,8 \pm 4$ мс ($n=8$ во всех случаях, рис. 2А). У мышей линии BALB/c ЧСС составляла 533 ± 21 уд./мин, что статистически значимо ниже ЧСС мышей B6CBAF1 ($p < 0,05$). Остальные параметры ЭКГ статистически значимо не различались: длительность PR-интервала у белых беспородных мышей составила $31,3 \pm 1$ мс, длительность зубца P – $15,9 \pm 1$ мс, длительность QRS-комплекса – $12,7 \pm 2$ мс, длительность QT интервала – $60,4 \pm 4$ мс ($n=7$ во всех случаях, рис. 2А). Параметры ЭКГ B6CBAF1 имели типичные для мы-

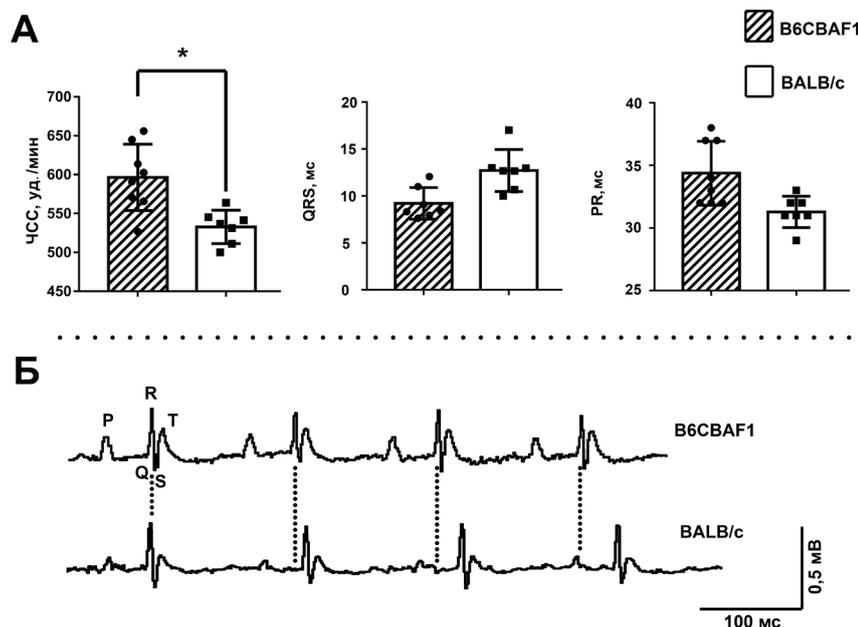


Рис. 2. А. Сравнение частоты сердечных сокращений (ЧСС, удары в минуту – уд./мин), длительности QRS-комплекса и PR-интервала у мышей B6CBAF1 и BALB/c. * – $p < 0,05$. Б. Репрезентативные примеры записи последовательных циклов ЭКГ у мышей линии B6CBAF1 (вверху) и мышей BALB/c (внизу). У мышей B6CBAF1 хорошо видны более короткие RR-интервалы, чем у BALB/c.

личаются усиленным материнским инстинктом, для B6CBAF1 характерна повышенная продолжительность жизни [15], у этих мышей ослаблены возрастные гистопатологические изменения в почках [16]; показано, что у данных гибридов изменена регуляция болевой чувствительности [17]. Следует отметить, что для получения гибридов используют, как правило, самцов линии CBA. В данной работе гибриды получены с использованием CBA-самок. Эта особенность скрещивания могла повлиять на формирование электрофизиологических свойств B6CBAF1.

В настоящее время считается, что такая особенность миокарда ЛВ грызунов как сдвиг ПП связана с повышенной натриевой трансмембранной проводимостью, избыточной хлорной проводимостью [18] и со сниженным уровнем экспрессии каналов, переносящих трансмембранный калиевый ток I_{K1} [19]. Отсутствие сдвига ПП позволяет предположить, что в ЛВ у мышей B6CBAF1 уровень экспрессии I_{K1} выше, чем у мышей BALB/c.

Также при записи ЭКГ в течение 60 мин у мышей B6CBAF1, как и у BALB/c не было обнаружено никаких электрокардиографических признаков нарушений ритма, связанных с эктопической автоматией или аномальной реполяризацией ПД.

Результаты экспериментов *in vivo* позволяют сделать несколько предположений касательно эктопии у интактных мышей. Возможно, что эктопическая автоматия оказывается подавлена при ритмическом воздействии со стороны пейсмекера сердца, генерирующего более высокий, чем эктопический ритм, благодаря, например, механизму иерархии автоматии [22] и, таким образом, не проявляется у здоровых животных без дополнительных патологических воздействий. В наших экспериментах с тканевыми препаратами, СПД не возникали при ритмической электрической стимуляции, что говорит в поддержку данного предположения. С другой стороны, известно, что фокальная активность может персистировать в

миокарде ЛВ или ЛП и при синусном ритме, при этом не распространяться и не «захватывать» весь суправентрикулярный миокард. В таком случае нарушений ритма не возникает, а на стандартной ЭКГ влияние этих фокусов не сказывается. Отсутствие ЭКГ признаков нарушений ритма у мышей B6CBAF1 не противоречит выявленной нами склонности миокарда предсердий и ЛВ к эктопической активности.

Таким образом, результаты данной работы позволяют предположить, что для ткани ЛВ и предсердий мышей гибридов B6CBAF1 характерна эктопическая автоматия и они могут рассматри-

ваться как, возможно, генетически обусловленная модель проаритмически трансформированного миокарда в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-34-00931, № 18-29-07005 мк).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schotten U., Verheule S., Kirchhof P., Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal // *Physiol. Rev.* 2011. Vol. 91. N 1. P. 256–325.
2. Chen Y.J., Chen S.A., Chang M.S., Lin C.I. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: Implication for the genesis of atrial fibrillation // *Cardiovasc. Res.* 2000. Vol. 48. N 2. P. 265–273.
3. Doisne N., Maupoil V., Cosnay P., Findlay I. Catecholaminergic automatic activity in the rat pulmonary vein: electrophysiological differences between cardiac muscle in the left atrium and pulmonary vein // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009. Vol. 297. N 1. P. 102–108.
4. Chen Y.J., Chen S.A. Thoracic vein arrhythmias // *Circ. J.* 2007. Vol. 71. Suppl. A. P. A20–A25.
5. Chen Y.J., Chen S.A. Electrophysiology of pulmonary veins // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2006. Vol. 17. N 2. P. 220–224.
6. Hosoyamada Y., Ichimura K., Koizumi K., Sakai T. Structural organization of pulmonary veins in the rat lung, with special emphasis on the musculature consisting of cardiac and smooth muscles // *Anat. Sci. Int.* 2010. Vol. 85. N 3. P. 152–159.
7. Kuzmin V.S., Abramochkin D.V., Sukhova G.S., Ashmarin I.P. Studies of the receptor mechanisms of the effects of ADP-ribose on the rat heart // *Neurochem. J.* 2008. N 2. P. 23–32.
8. Boukens B.J., Rivaud M.R., Rentschler S., Coronel R. Misinterpretation of the mouse ECG: ‘musing the waves of *Mus musculus*’ // *J. Physiol.* 2014. Vol. 592. N 21. P. 4613–4626.
9. Tsuneoka Y., Kobayashi Y., Honda Y., Namekata I., Tanaka H. Electrical activity of the mouse pulmonary vein myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* 2012. Vol. 119. N 3. P. 287–292.
10. Wit A.L., Boyden P.A. Triggered activity and atrial fibrillation // *Heart Rhythm.* 2006. Vol. 4. Suppl. 3. P. S17–S23.
11. Iwasaki Y.K., Nishida K., Kato T., Nattel S. Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management // *Circulation.* 2011. Vol. 124. N 20. P. 2264–2274.
12. Barajas-Martinez H., Goodrow R.J., Hu D., Patel P., Desai M., Panama B.K., Treat J.A., Aistrup G.L., Cordeiro J.M. Biophysical and molecular comparison of sodium current in cells isolated from canine atria and pulmonary vein // *Pflugers Arch.* 2017. Vol. 469. N 5–6. P. 703–712.
13. Holmes A.P., Yu T.Y., Tull S., Syeda F., Kuhlmann S.M., O'Brien S.M., Patel P., Brain K.L., Pavlovic D., Brown N.A., Fabritz L., Kirchhof P. A regional reduction in Ito and IKach in the murine posterior left atrial myocardium is associated with action potential prolongation and increased ectopic activity // *PLoS One.* 2016. Vol. 11. N 5. e0154077.
14. Raso A., Dirkx E., Philippen L.E., et al. Therapeutic delivery of miR-148a suppresses ventricular dilation in heart failure // *Mol. Ther.* 2019. Vol. 27. N 3. P. 584–599.
15. Harrison D.E., Archer J.R. Genetic differences in effects of food restriction on aging in mice // *J. Nutr.* 1987. Vol. 117. N 2. P. 376–382.
16. Hackbarth H., Harrison D.E. Changes with age in renal function and morphology in C57BL/6, CBA/HT6, and B6CBAF1 mice // *J. Gerontol.* 1982. Vol. 37. N 5. P. 540–547.
17. Damaj M.I., Fonck C., Marks M.J., Deshpande P., Labarca C., Lester H.A., Collins A.C., Martin B.R. Genetic approaches identify differential roles for alpha4beta2* nicotinic receptors in acute models of antinociception in mice // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. Vol. 321. N 3. P. 1161–1169.
18. Okamoto Y., Kawamura K., Nakamura Y., Ono K. Pathological impact of hyperpolarization-activated chloride current peculiar to rat pulmonary

vein cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014. Vol. 66. P. 53–62.

19. Malécot C.O., Bredeloux P., Findlay I., Maupoil V. A TTX-sensitive resting Na⁺ permeability contributes to the catecholaminergic automatic activity in rat pulmonary vein // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2015. Vol. 26. N 3. P. 311–319.

20. Xu H., Li H., Nerbonne J.M. Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 alpha subunit // *J. Physiol.* 1999. Vol. 519. Pt. 1. P. 11–21.

21. Voigt N., Dobrev D. Atrial-selective potassium channel blockers // *Card. Electrophysiol. Clin.* 2016. Vol. 8. N 2. P. 411–421.

22. Graziani A.T., Vassalle M. Mechanisms underlying overdrive suppression and overdrive excitation in guinea pig sino-atrial node // *J. Biomed. Sci.* 2006 Vol. 13. N 5. P. 703–720.

Поступила в редакцию 29.03.2019 г.

После доработки 02.05.2019 г.

Принята в печать 08.05.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SUPRAVENTRICULAR MYOCARDIUM OF THE HEART OF THE B6CBAF1 MICE STRAIN REVEALS GENETICALLY DETERMINED ARRHYTHMOGENIC PROPERTIES DUE TO ECTOPIC AUTOMATICITY AND TRIGGERED ACTIVITY

V.M. Potekhina^{1,*}, O.A. Averina², V.S. Kuzmin^{1,3}

¹*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–40, Moscow, 119234, Russia;*

³*Department of Physiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia*

*e-mail: vm-potekhina@yandex.ru

A lot of studies aimed to the investigation the mechanisms of occurrence and ways to prevent of supraventricular arrhythmias – in particular, atrial fibrillation. The origin of the atrial fibrillation in most part of cases is associated with abnormal electrophysiological properties of the pulmonary veins (PV) myocardium. The most important of characteristic of PV myocardium is highly prone to the ectopic automaticity. Moreover, no murine strains with hereditary predisposition to PVs-derived ectopy or arrhythmogenicity are known to the present moment. Nevertheless, mice become more frequent objects in the heart electrophysiology studies. Thus, the aim of the present investigation was to characterize, bioelectric properties of the PV and atrial myocardium of the F1 hybrids (B6CBAF1) received by crossing C57Bl/6 and CBA strains. In *ex vivo* experiments the action potentials were recorded in PV and atrial multicellular perfused preparations isolated from B6CBAF1 and control BALB/c mice heart using standard sharp microelectrodes technique. In addition, in *in vivo* experiments standard approach was used to receive and analyze ECG in B6CBAF1 and BALB/c mice. In 80% of experiments the PV myocardium of B6CBAF1 exhibits permanent ectopic automaticity. Spontaneous action potential (SAP) in 55% of experiments were characterized by excessive afterdepolarizations, which caused extreme repolarization delay reached 1–20 s. Besides PV, the atrial working myocardium of B6CBAF1 in 80% of cases demonstrated SAPs. Unlike B6CBAF1, both BALB/c PV and atrial myocardium were unable to generate permanent SAPs or demonstrate repolarization abnormalities in basal conditions. The *in vivo* ECG recording revealed no arrhythmia episodes of significant changes of ECG parameters in B6CBAF1 mice except increased heart beat frequency. It is possible that that B6CBAF1 hybrids are the first time described mouse strain with the intrinsically or probably hereditary arrhythmogenic supraventricular myocardium demonstrating an ectopic automaticity and triggered activity.

Keywords: C57Bl/6, CBA, heart, pulmonary veins, atrial fibrillation, ectopy automaticity, triggered automaticity, early post-depolarization, arrhythmia

Сведения об авторах

Потехина Виктория Маратовна – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: *vm-potekhina@yandex.ru*

Аверина Ольга Александровна – мл. науч. сотр. НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-11; e-mail: *averina.olga.msu@gmail.com*

Кузьмин Владислав Стефанович – канд. биол. наук., доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; вед. науч. сотр. кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: *ku290381@mail.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.821.6

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РИТМИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ЭЭГ НА ПЕРВОЙ СТАДИИ ДНЕВНОГО СНА

И.А. Яковенко*, Д.Е. Шумов, Н.Е. Петренко, М.К. Козлов, В.Б. Дорохов

*Лаборатория нейробиологии сна и бодрствования, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Россия, 117485, г. Москва, Бутлерова, д. 5а
e-mail: irinayakovenko@mail.ru

Взаимодействие ритмов энцефалограммы (ЭЭГ) является важным показателем функционального состояния мозга человека. В настоящее время существуют три теории, объясняющие такое взаимодействие: а) коммуникация нейронных популяций; б) нейронное взаимодействие; в) взаимодействие генераторов изучаемых частот. Известно, что тета-ритм связывают с функционированием кортико-гиппокампальной системы, альфа-ритм – таламо-кортикальной, а бета-ритм – может быть включен в работу обеих корково-подкорковых систем. Представленная работа может прояснить особенности взаимодействия вышеописанных корково-подкорковых систем. Существует ряд публикаций, посвященных изучению взаимодействия ритмов ЭЭГ при различных видах психической деятельности. При этом в последние годы возник интерес к связи ритмов на разных стадиях сна. В задачу нашей работы входило изучение взаимодействия тета-, альфа- и бета-ритмов ЭЭГ на первой стадии сна. В исследовании приняли участие 22 испытуемых в возрасте от 18 до 22 лет. Регистрировалась многоканальная ЭЭГ во время дневного сна участников эксперимента. Для обработки выбирали отрезки ЭЭГ с хорошо выраженным тета-ритмом, поскольку он является «доминирующим» на первой стадии сна. Затем осуществлялась диапазонная фильтрация сигнала ЭЭГ. Были выделены следующие ритмы: тета-ритм (4–7 Гц), альфа-ритм (8–13 Гц), бета-1- (14–19 Гц) и бета-2-ритмы (20–25 Гц). После этого для каждого диапазона на каждой секунде вычислялась средняя амплитуда как корень квадратный из дисперсии сигнала ЭЭГ. В качестве меры, оценивающей взаимодействие ритмов ЭЭГ, использовали коэффициент корреляции Пирсона. В результате было установлено, что первая стадия сна характеризуется: а) отсутствием связей тета-ритма с другими ритмами; б) наличием связей альфа-бета-1-, альфа-бета-2- и бета-1-бета-2-ритмов-; в) ростом амплитуды тета-ритма; г) снижением амплитуд альфа- и бета-ритмов. Как уже отмечалось выше, тета-ритм связывают с функционированием кортико-гиппокампальной системы, а альфа-ритм – таламо-кортикальной. В нашей работе показаны два сосуществующих вида функционирования этих систем: 1) «независимый» кортико-гиппокампального круга и 2) связанный с другими ритмами, в частности, с бета-ритмом, таламо-кортикальный. Вероятно, эта неоднородность является условием того, что первая стадия сна может быть нестабильной. Показано увеличение амплитуды тета-ритма на первой стадии сна, по отношению к этому показателю в состоянии спокойного бодрствования. Это традиционно связывается с увеличением восходящих влияний лимбических структур мозга. Амплитуды альфа- и бета-ритмов на первой стадии сна достоверно уменьшились, что говорит об ослаблении влияния префронтальных отделов коры на центры заднего гипоталамуса. Исходя из этого, можно предположить, что наступление первой стадии сна может обеспечиваться разнородным характером взаимодействия ритмов, и, соответственно, различным функционированием кортико-гиппокампальной и таламо-кортикальной систем.

Ключевые слова: взаимодействие ритмов ЭЭГ, альфа-ритм, тета-ритм, бета-ритм, средняя амплитуда ритмов ЭЭГ, таламо-кортикальная система, кортико-гиппокампальная система, первая стадия сна

Проблема исследования взаимодействия ритмов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) в настоящее время является актуальной. Когнитивные процес-

сы мозга требуют скоординированной активности нейронных сетей, участвующих в генерации ритмов ЭЭГ, которые, в свою очередь, обеспе-

чивают высшие психические функции человека. Предполагается, что в ЭЭГ это отражается в виде координации активности в разных частотных диапазонах [1]. В работах де Мунка и Рупун [2, 3] показано взаимодействие альфа- и бета-ритмов. Осцилляторы альфа- и бета-ритмов «включаются» и «выключаются» одновременно; бета-1- и бета-2-ритмы могут генерировать альфа-ритм. Показано, что у больных с нейрогенной болью, эпилепсией и двигательными расстройствами существует взаимодействие тета- и бета-ритмов активности ядер таламуса. Делается предположение о строгом функциональном взаимодействии генераторов этих ритмов [4]. В состоянии спокойного бодрствования у пациентов с болезнью Альцгеймера выявлено увеличение взаимодействия быстрых (бета-/гамма-) и медленных (дельта-/тета-/альфа-) ритмов ЭЭГ по сравнению со здоровыми испытуемыми [5].

В наших работах, посвященных изучению когнитивной установки, была выявлена связь альфа- и бета-2-ритмов у студентов с ригидной формой установки и взаимодействие бета-2- и тета-ритмов у студентов с пластичной формой когнитивной установки [6].

В настоящее время существует три объяснения взаимодействия различных ритмов ЭЭГ: а) коммуникация нейронных популяций; б) нейронное взаимодействие; в) взаимодействие генераторов изучаемых частот [7]. Базируясь на первом объяснении, мы высказали предположение о том, что при усилении корреляционных связей между ритмами осуществляется взаимодействие различных популяций нейронов, генерирующих различные ритмы, внутри одной корково-подкорковой системы, объединяя ее разные структуры, или же объединяя структуры двух или более корково-подкорковых систем.

В последнее время появился ряд работ по исследованию взаимодействия ритмов ЭЭГ во сне [8–10]. Выявлен факт взаимодействия быстрых и медленных ритмов на третьей стадии сна [11]. Показано взаимодействие тета- и гамма-ритмов в парадоксальной стадии сна [12]. В нашей работе, проведенной на студентах с нарушениями сна, выявлено отсутствие связей альфа- и тета-ритмов с бета-ритмом при выполнении задания на распознавание эмоционального выражения лица [13].

Первая стадия сна – переходная стадия от бодрствования ко сну. Она интересна тем, что в ней могут сохраняться как ЭЭГ-характеристики состояния спокойного бодрствования, так и проявляться особенности ЭЭГ, характерные для сна. Классически первая стадия сна характеризуется снижением мощности альфа-ритма и усилением тета-ритма [14]. В связи с этим возникает закономерный интерес к особенностям взаимодействия

ритмов ЭЭГ на первой стадии сна.

Задачей проведенной работы являлась оценка амплитудного взаимодействия тета-, альфа- и бета-ритмов ЭЭГ на первой стадии сна, а также исследование изменения ритмических связей в состоянии спокойного бодрствования.

Материалы и методы

В эксперименте приняли участие 22 испытуемых, студенты медицинского университета (12 мужчины и 10 женщин в возрасте от 18 до 22 лет, средний возраст которых составлял $19,8 \pm 0,8$ года). Перед началом эксперимента испытуемым предлагался опросник «САН», который фиксировал их функциональное состояние, качество ночного сна определяли с помощью Каролинской шкалы сонливости. Участники подписывали информированное согласие на участие в эксперименте. Эксперимент проводился в дневное время, с 13 до 16 часов. Из 22 участников для выделения стадий сна использованы данные 16 человек. У 6 испытуемых не наступала первая стадия сна или не удалось зарегистрировать безартефактную ЭЭГ. Испытуемый находился в звукозаглушающем, защищенном от света помещении, при стабильной температуре 24°C . В течение опыта шла запись с частотой дискретизации 500 Гц 16-ти каналов ЭЭГ, расположенных на скальпе по схеме 10–20, и 2-х каналов электроокулограммы (ЭОГ), при помощи беспроводного аппаратно-программного комплекса «Нейрополиграф 24» (ПО «Нейротех», Россия). Отведение ЭЭГ монополярное.

После наложения электродов испытуемый располагался на кушетке. Далее 3 мин велась фоновая регистрация ЭЭГ и ЭОГ при закрытых глазах. Затем в течение 20 мин регистрировалась ЭЭГ сна. На протяжении этого времени у испытуемых развивалась первая стадия сна, которая наступала в разное время. Первая и вторая стадии сна определялись по стандартным критериям [15]. Анализировала каждые 20 с зарегистрированной ЭЭГ. Первая стадия сна характеризуется снижением мощности альфа-ритма и усилением тета-ритма. Для контроля временных границ первой стадии сна определяли время наступления второй стадии сна, характеризующейся наличием не менее одного сонного веретена, что является основным критерием ее наступления. Это, в свою очередь, являлось окончанием первой стадии. Длительность первой стадии у разных испытуемых была очень вариабельна. Находили наименьшую длительность первой стадии. Изучались 20–30-секундные безартефактные отрезки ЭЭГ первой стадии сна. Поскольку у большинства испытуемых она была больше, для статистического анализа брали отрезки ЭЭГ упомянутой длительности. Отрезки ЭЭГ выбирали с наиболее выраженным тета-ритмом,

поскольку он является «доминирующим» на первой стадии сна. Далее производилась диапазонная фильтрация сигнала ЭЭГ: выделялись тета-ритм (4–7 Гц), альфа-ритм (8–13 Гц), бета-1- (14–19 Гц) и бета-2-ритм (20–25 Гц). Отдельно для фильтрации по каждому диапазону посекундно вычислялась средняя амплитуда как корень квадратный из дисперсии ЭЭГ-сигнала. Этот метод оценки изменений амплитуды по диапазонам является более экономичным по объему необходимых вычислений в сравнении с ранее использованным нами [6] вейвлет-преобразованием.

Для статистического анализа использовали средние значения амплитуд изучаемых ритмов ЭЭГ. Их вычисляли по значениям величин функции вариации соответствующих ритмов, усредненных на 20–30 односекундных отрезках ЭЭГ. Так же проводилось усреднение по всем регистрируемым отведениям ЭЭГ.

Для оценки статистической значимости результатов использовали дисперсионный анализ (ANOVA RM). В качестве внутригруппового фактора рассматривали фактор «состояние» (2 уровня: состояние спокойного бодрствования и первая стадия сна). Оценивалась значимость его влияния для каждого исследуемого ритма отдельно. Разница амплитуд исследовалась так же с помощью парного критерия Стьюдента.

В качестве меры, оценивающей взаимодействие двух поддиапазонов бета-ритма с тета- и альфа-ритмами, использовали коэффициент корреляции Пирсона. Коэффициент корреляции изучаемых ритмических диапазонов вычислялся отдельно для разных исследуемых ситуаций: состояние спокойного бодрствования; первая стадия сна. Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ «SPSS, v.13» (SPSS Inc. IBM, США).

Результаты

Проведено сравнение взаимодействий тета-, альфа-, бета-1- и бета-2-ритмов ЭЭГ в состоянии спокойного бодрствования (фон с закрытыми глазами) и на первой стадии сна. В состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами в эксперименте выявлено наибольшее число связей ритмов: тета-ритм взаимодействовал с альфа-ритмом и обоими поддиапазонами бета-ритма, альфа-ритм – с тета- и бета-ритмами, а также оба поддиапазона бета-ритма – друг с другом (табл. 1).

На первой стадии сна показано значительное уменьшение числа связей ритмов по сравнению с состоянием спокойного бодрствования. Выявлено три пары связей: альфа – бета-1, аль-

Таблица 1

Корреляция ритмов ЭЭГ по их средней амплитуде в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами

Этапы исследования	Ритмы ЭЭГ	Статистические значения
Спокойное бодрствование	тета – бета-1	$r=0,63$; $P=0,012$
	тета – бета-2	$r=0,69$; $P=0,005$
	альфа – бета-1	$r=0,72$; $P=0,002$
	альфа – бета-2	$r=0,73$; $P=0,002$
	альфа – тета	$r=0,74$; $P=0,001$
	бета-1 – бета-2	$r=0,85$; $P=0,000$

фа – бета-2 и бета-1 – бета-2 (табл. 2). Причиной уменьшения связей является отсутствие связей тета-ритма с быстрыми ритмами.

Дисперсионный анализ (ANOVA RM) показал, что фактор «состояние» оказывает значимое влияние на суммарные значения амплитуд тета- ($F(1;12)=7,42$; $P=0,018$), альфа- ($F(1;12)=14,01$; $P=0,003$), бета-1- ($F(1;12)=14,91$; $P=0,002$) и бета-2- ($F(1;12)=36,00$; $P=0,0001$) ритмов. Таким образом, амплитудные показатели исследуемых ритмов значимо изменяются при переходе от фо-

Таблица 2

Корреляция ритмов ЭЭГ по их средней амплитуде на первой стадии сна

Этапы исследования	Ритмы ЭЭГ	Статистические значения
Спокойное бодрствование	тета – бета-1	
	тета – бета-2	
	альфа – бета-1	$r=0,73$; $P=0,001$
	альфа – бета-2	$r=0,83$; $P=0,000$
	альфа – тета	
	бета-1 – бета-2	$r=0,90$; $P=0,000$

нового состояния с закрытыми глазами к первой стадии сна.

Для выяснения характера изменений амплитудных характеристик ЭЭГ было проведено парное сопоставление (по критерию Стьюдента)

Таблица 3

Статистические различия средних значений амплитуды в диапазоне тета-, альфа- и бета-ритмов на разных этапах исследования

Ритмы ЭЭГ	Спокойное бодрствование	Первая стадия сна	Статистические значения
тета – ритм	6,24+0,36	7,31+0,36	$t=4,21$; $P=0,001$
альфа – ритм	11,82+1,42	6,66+0,82	$t=-3,83$; $P=0,002$
бета-1 – ритм	4,98+0,48	3,71+0,31	$t=-3,23$; $P=0,007$
бета-2 – ритм	3,44+0,22	2,50+0,23	$t=-5,77$; $P=0,000$

средних значений амплитуд исследуемых ритмов в состоянии спокойного бодрствования и на первой стадии сна (табл. 3). Показаны достоверные различия амплитуд ритмов в исследуемых состояниях. Выявлено достоверное увеличение амплитуды тета-ритма в первой стадии сна. При этом отмечено уменьшение амплитуд альфа-ритма и поддиапазонов бета- ритма.

Итак, первая стадия сна характеризовалась: а) отсутствием связей тета-ритма с другими ритмами; б) ростом амплитуды тета-ритма; в) снижением амплитуд альфа- и бета-ритмов.

Обсуждение результатов

Взаимодействие ритмов ЭЭГ является информативной характеристикой для определения функционального состояния испытуемых. В нашей ранней работе [6] показана связь бета-ритма с альфа- и тета-ритмами при выработке когнитивной установки. В работе, выполненной на студентах, с нарушения сна, выявлено отсутствие связей бета-ритма с альфа- и тета-ритмами при формировании когнитивной установки [13]. Известно, что бета-ритм может регистрироваться не только в коре больших полушарий, но и в структурах таламуса и гиппокампа [16, 17]. Традиционно таламо-кортикальную и кортико-гиппокампальную корково-подкорковые системы связывают с появлением в ЭЭГ соответственно альфа- и тета-ритмов. Вероятно, включение бета-ритма в комплексы «бета – альфа» и «бета – тета» позволяет поддерживать необходимый уровень активации этих корково-подкорковых систем для осуществления психической деятельности. В работе, посвященной изучению взаимодействия ритмов во сне [8], показано, что наибольшее число связей ритмов наблюдается на третьей стадии сна, а самое незначительное – в парадоксальной стадии сна, как у здоровых, так и у больных эпилепсией. В работе Ли [10] показано значимое взаимодействие медленных осцилляций (0,1–1,5 Гц) и веретен (12–16 Гц) от первой к четвертой стадии сна.

В нашей работе исследовалось взаимодействие ритмов на первой стадии сна. Было выявлено существенное сокращение связей по сравнению с состоянием спокойного бодрствования с закрытыми глазами. Известно, что первая стадия сна характеризуется уменьшением амплитуды альфа-ритма и ростом – тета-ритма ЭЭГ [14]. Казалось логичным, что «доминирующий» тета-ритм в нашем исследовании будет каким-либо образом связан с другими ритмами. Наше ожидание не оправдалось. При этом сохранились связи альфа- и бета-ритмов. Почему же так происходит? В работе Е [18] высказывается мнение, что уменьшение количества связей ритмов позволяет высвободить ресурс для объединения изучаемых

ритмов в какие-то другие пары. Возможно, в дальнейших стадиях сна тета-ритм будет интегрирован с каким-то иным ритмом. Первая стадия сна включает в себя характеристики ЭЭГ как сна, так и бодрствования. Вероятно, поэтому при снижении амплитуды альфа- и бета-ритмов сохраняется их связь, которая в последующих стадиях сна может трансформироваться как в более устойчивую, что может привести к просыпанию, так и в менее устойчивую, что в свою очередь приведет к углублению сна.

Как уже отмечалось выше, тета-ритм связывают с функционированием кортико-гиппокампальной системы, а альфа-ритм – таламо-кортикальной. В нашей работе показаны два сосуществующих вида функционирования этих систем: «независимый» кортико-гиппокампального круга и связанный с другими ритмами, – в частности, с бета-ритмом, – таламо-кортикальный. Вероятно, эта неоднородность является условием того, что первая стадия сна может быть нестабильной.

Было проведено изучение зависимости динамики амплитуды изучаемых ритмов ЭЭГ от стадии эксперимента. Показано ожидаемое увеличение амплитуды тета-ритма на первой стадии сна по сравнению с состоянием спокойного бодрствования. Это традиционно связывается с увеличением восходящих влияний лимбических структур мозга. Амплитуды альфа- и бета-ритмов на первой стадии сна достоверно уменьшились, что говорит об ослаблении влияния префронтальных отделов коры на центры заднего гипоталамуса. Эти данные в определенной мере согласуются с результатами, полученными в работе Е [18], в которой отмечено уменьшение мощности бета-ритма по мере увеличения глубины сна.

В заключение можно сказать, что первая стадия сна в эксперименте характеризовалась: а) отсутствием связей тета-ритма с другими ритмами; б) наличием трех пар связей ритмов ЭЭГ: альфа – бета-1, альфа – бета-2 и бета-1 – бета-2; в) ростом амплитуды тета-ритма и снижением амплитуд альфа- и бета-ритмов. На основании этого можно предположить, что наступление первой стадии сна может обеспечиваться разнородным характером взаимодействия ритмов, и, соответственно, различным функционированием кортико-гиппокампальной и таламо-кортикальной систем.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-36-00025-ОГН-МОЛ-А1).

Все испытуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был одобрен этической комиссией Института высшей нервной деятель-

ности и нейрофизиологии. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Voytek B., Knight R.T.* Dynamic network communication as a unifying neural basis for cognition, development, aging, and disease // *Biol. Psychiatry*. 2015. Vol. 77. N 12. P. 1089–1097.
2. *de Munk J., Goncalves S., Mammoliti R., Heethaar R., Lopes da Silva F.* Interaction between different EEG frequency bands and their effect on alpha–fMRI correlation // *Neuroimage*. 2009. Vol. 47. N 1. P. 69–76.
3. *Roopun A.K., Kramer M.A., Carrasedo L.M., Kaiser M., Davies C.H., Traub R.D., Koppel N.J., Whittington M.A.* Temporal interaction between cortical rhythms // *Front. Neurosci.* 2008. Vol. 2. N 2. P. 145–154.
4. *Rodriguez-Martinez E. I., Barriga-Paulino C. I., Rojas-Benjumea M. A., Gomez C.M.* Co-maturation of theta and low–beta rhythms during child development // *Brain Topogr.* 2015. Vol. 28. N 2. P. 250–260.
5. *Wang J., Fang Y., Wang X., Yang H., Yu X., Wang H.* Enhanced gamma activity and cross-frequency interaction of resting-state electroencephalographic oscillations in patients with Alzheimer’s disease // *Front. Aging Neurosci.* 2017. Vol. 9: 243.
6. *Яковенко И.А., Петренко Н.Е., Черемушкин Е.А., Козлов М.К.* Взаимодействие ритмов ЭЭГ при установке на лицевую экспрессию // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2017. Т. 103. № 7. С. 825–834.
7. *Niculin V., Nolte G., Curio G.* Cross-frequency decomposition. A novel technique for studying interactions between neuronal oscillation with different frequencies // *Clin. Neurophysiol.* 2012. Vol. 123. N 7. P. 1353–1360.
8. *Amiri M., Frauscher B., Gotman J.* Phase-amplitude coupling is elevated in deep sleep and in the onset of focal epileptic seizures // *Front. Hum. Neurosci.* 2016. Vol. 10: 387.
9. *Ladenbauer J., Ladenbauer J., Külzow N., de Boer R., Avramova E., Grittner U., Flöel A.* Promoting sleep oscillations and their functional coupling by transcranial stimulation enhances memory consolidation in mild cognitive impairment // *J. Neurosci.* 2017. Vol. 37. N 30. P. 7111–7124.
10. *Li D., Ni M., Dun S.* Phase-amplitude coupling in human scalp EEG during NREM sleep // 8th International Conference on BioMedical Engineering and Informatics (BMEI Shenyang, China, 14–16 October 2015), IEEE Catalog Number. 2015. P. 219–223.
11. *Takeuchi S., Mima T., Murai R., Shimazu H., Isomura Y., Tsujimoto T.* Gamma oscillations and their cross-frequency coupling in the primate hippocampus during sleep // *Sleep*. 2015. Vol. 38. N 7. P. 1085–1091.
12. *Scheffzuk C., Kukushka V.I., Vyssotski A.L., Draguhn A., Tort A.B.L., Brankač J.* Selective coupling between theta phase and neocortical fast gamma oscillations during REM-sleep in mice // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6. N 12. e28489.
13. *Яковенко И.А., Петренко Н.Е., Черемушкин Е.А., Дорохов В.Б.* Функциональная роль связи бета-ритма с медленными ритмами у студентов с нарушениями сна при формировании установки на лицевую экспрессию // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2018. Т. 104. № 10. С. 1238–1249.
14. *Klimesch W.* EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis // *Brain Res. Rev.* 1999. Vol. 29. N 2–3. P. 169–195.
15. *Iber C., Ancoli-Israel S., Chesson A., Quan S.* The AASM manual for the scoring of sleep and associated events; rules, terminology and technical specifications. Westchester: American Academy of Sleep Medicine, 2007. 59 pp.
16. *Bibbig A., Middleton S., Racca C., Gillies M.J., Garner H., LeBeau F.E.N., Davies C.H., Whittington M.A.* Beta rhythms (15–20) generated by nonreciprocal communication in hippocampus // *J. Neurophysiol.* 2007. Vol. 97. N 4. P. 2812–2823.
17. *Linas R., Grace A., Yarom Y.* *In vitro* neurons in mammalian cortical layer 4 exhibit intrinsic oscillatory activity in the 10- to 50-Hz frequency range // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991. Vol. 88. N 3. P. 897–901.
18. *Yeh Ch.-H., Shi W.* Identifying phase-amplitude coupling in cyclic alternating pattern using masking signals // *Sci. Rep.* 2018. Vol.8. N 1. P. 2649–2657.

Поступила в редакцию 31.01.2019 г.
После доработки 08.04.2019 г.
Принята в печать 16.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE STUDY OF COUPLING RHYTHMIC COMPONENTS OF THE EEG DURING THE FIRST STAGE OF DAY SLEEP

I.A. Yakovenko*, D.E. Shumov, N.E. Petrenko, M.K. Kozlov, V.B. Dorokhov

*Neurobiology of Sleep and Wake Lab, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Butlerova str. 5a, Moscow, 117485, Russia***e-mail: irinayakovenko@mail.ru*

The coupling of EEG rhythms is an important indicator of the functional state of the human brain. Currently, there are three theories explaining such interaction: a) communication of neural populations; b) neural interaction; c) interaction of generators of the studied frequencies. It is known that theta-rhythm is associated with the functioning of the cortico-hippocampal system, and alpha-thalamo-cortical, and beta-can be included in the work of both cortico-subcortical systems. The presented work can clarify the features of the interaction of the above-described cortical-subcortical systems. There are a number of works devoted to the study of the coupling of EEG rhythms in various types of mental activity. In recent years, there has been interest in the connection of rhythms at different stages of sleep. The task of our work was to study the interaction of theta-, alpha- and beta-rhythms of EEG in the first stage of sleep. The study involved 22 subjects aged 18 to 22 years. Multichannel EEG was recorded during the daytime sleep of the experiment participants. EEG segments with a well-defined theta-rhythm were selected for processing, since it is «dominant» at the first stage of sleep. Then the range filtering of the EEG signal was carried out. The following rhythms were distinguished: theta-rhythm (4–7 Hz), alpha-rhythm (8–13 Hz), beta-1- (14–19 Hz) and beta-2-rhythm (20–25 Hz). After that, for each range at each second, the average amplitude was calculated as the square root of the EEG signal dispersion. Pearson correlation coefficient was used as a measure to evaluate the interaction of EEG rhythms. As a result, it was found that the first stage of sleep was characterized by: a) lack of connections of theta-rhythm with other rhythms; b) the presence of links alpha-beta-1-, alpha-beta-2- and beta-1-beta-2-rhythms, c) the increase of the amplitude of the theta-rhythm and d) decrease the amplitude of alpha- and beta-rhythms. As noted above, theta-rhythm is associated with the functioning of the cortico-hippocampal system, and alpha – thalamo-cortical. In our work two coexisting types of functioning of these systems are shown: «independent» cortical-hippocampal circle and connected with other rhythms, in particular with beta-rhythm, thalamo-cortical. Probably, this heterogeneity is a condition that the first stage of sleep can be unstable. An increase in the amplitude of the theta-rhythm at the first stage of sleep in relation to the state of quiet wakefulness is shown. This is traditionally associated with an increase in the ascending effects of the limbic structures of the brain. The amplitudes of alpha- and beta-rhythms at first stage of sleep were significantly reduced, which indicates a weakening of the influence of prefrontal cortex on the centers of the posterior hypothalamus. Based on this, it can be assumed that the onset of first stage of sleep can be provided by the heterogeneous nature of the coupling of rhythms, and accordingly, the different functioning of the cortico-hippocampal and thalamo-cortical systems.

Keywords: *coupling the EEG rhythms, alpha-rhythm, theta-rhythm, beta-rhythm, mean amplitude rhythms EEG, thalamo-cortical system, cortico-hippocampal system, first sleep stage*

Сведения об авторах

Яковенко Ирина Анатольевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-92-05; e-mail: *irinayakovenko@mail.ru*

Шумов Дмитрий Ефимович – инженер Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-92-05; e-mail: *dmitry-shumov@yandex.ru*

Петренко Надежда Евгеньевна – канд. биол. наук, науч. сотр. Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-92-05; e-mail: *xhthon@yandex.ru*

Козлов Михаил Кириллович – вед. инженер Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-92-05; e-mail: *mkkozlov@yandex.ru*

Дорохов Владимир Борисович – докт. биол. наук., зав. лабораторией нейробиологии сна и бодрствования Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-92-05; e-mail: *vbdorokhov@mail.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.481.11:591.5

СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ АРХИТЕКТониКИ ГИППОКАМПА
РЫЖЕЙ ПОЛЕВКИ (*CLETHRIONOMYS GLAREOLUS*, RODENTIA)

В.А. Яскин

Кафедра зоологии позвоночных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: yaskin_v@mail.ru

Прослежена сезонно-возрастная изменчивость архитектоники гиппокампа рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) из природной популяции (Московская область). Сравнивали животных осенней генерации на трех этапах жизненного цикла: осенью (возраст 1–3 мес.), в период зимнего уменьшения массы мозга (5–7 мес.) и после весеннего «скачка роста» (9–11 мес.) в летний период. Зимняя выборка отличалась статистически достоверно меньшей ($p < 0,05$) площадью среза как зубчатой извилины, так и поля СА3 гиппокампа. Близким по величине зимним уменьшением площади профильного поля характеризовались все изученные отделы гиппокампального комплекса: молекулярный и гранулярный слои зубчатой извилины, а также слои пирамидных клеток и волокон поля СА3 гиппокампа (9,4–13,3%). В весенний период рост гиппокампального комплекса возобновлялся. У перезимовавших полевок в летний период размер отделов гиппокампа был больше, чем у полевок в зимней выборке на 5,4–27,3%. Полученные результаты свидетельствуют о значительной морфологической пластичности основных структурных компонентов гиппокампа в связи с воздействием сезонных факторов у незимоспящих грызунов.

Ключевые слова: гиппокамп, зубчатая извилина, архитектоника, морфологическая пластичность, сезонная изменчивость, рыжая полевка

Зимнее уменьшение высоты черепа и массы мозга, описанное впервые у землероек рода *Sorex* (Insectivora) [1, 2], было зарегистрировано также у ряда видов полевок (Rodentia, Cricetidae) [3, 4]. Хотя явление Денеля известно уже более полувека, его механизмы и функциональная значимость остаются до конца не выясненными.

Было установлено, что масса разных отделов головного мозга изменяется неодинаково, наибольшую регрессию размеров в зимний период как у землероек, так и у полевок претерпевают передние отделы головного мозга, практически нет сезонной изменчивости по массе продолговатого мозга, мозжечка и обонятельных луковиц [4, 5]. Среди отделов переднего мозга наибольшее весеннее увеличение после зимней регрессии, а также амплитуда сезонных колебаний характерны для массы гиппокампа [5, 6]. Сезонная изменчивость строения гиппокампа была отмечена у бурозубок рода *Sorex* (Insectivora) [7–9].

Морфологические изменения переднего мозга, органа сложных форм поведения, видимо, должны быть связаны также с изменением поведения животных. Гиппокамп, крупная структура переднего мозга, играет важную роль в ориента-

ции и пространственном запоминании у млекопитающих и птиц. Он формирует когнитивную карту индивидуальной среды и поэтому вовлечен преимущественно в обработку пространственной информации [10]. Роль гиппокампа в пространственном обучении продемонстрирована, в частности, на рыжих полевках [11]. Имеются данные, характеризующие однонаправленную сезонную изменчивость размера гиппокампа и пространственного поведения у рыжих полевок [6], а также бурозубок рода *Sorex* [7]. Гиппокамп проявляет такую же значительную пластичность, как и пространственное поведение, в частности, наблюдается рост этого отдела мозга в позднем постнатальном онтогенезе после зимней регрессии в период, когда отмечается увеличение индивидуальных участков животных [6, 7].

Ранее были выявлены сезонные изменения архитектоники новой коры рыжих полевок — в частности, отмечено достоверное зимнее увеличение числа клеток на единицу площади среза [12]. На основании сопоставления данных о снижении относительной площади нейронов в новой коре, уменьшении размеров нейронов в V слое теменной области коры и увеличении числа клеток на

единицу площади среза было сделано предположение о зимнем уменьшении размеров нейронов во всех слоях коры или в большей их части.

Архитектонические механизмы сезонной изменчивости массы гиппокампа остаются невыясненными. Целью работы было проследить на гистологическом уровне на примере рыжей полевки за изменениями, происходящими в гиппокампальном комплексе незимоспящих мелких млекопитающих в период сезонных колебаний массы их головного мозга и массы гиппокампа. Задача заключалась в установлении того, какие именно отделы гиппокампа обладают структурной лабильностью.

Материалы и методы

Исследовали мозг рыжих полевок, отловленных в разные сезоны в Одинцовском районе Московской области. Полевок отлавливали живоловками. Возраст зверьков был установлен по степени развития корней зубов [13], учитывали также размеры тела, степень развития тимуса и генеративной системы, а также морфологические признаки меченых эталонных животных с известным календарным возрастом. Исследовали мозг полевок примерно одного времени рождения из «осенней» генерации (появлялись в популяции с конца июля — начала августа по сентябрь, в год своего рождения половой зрелости не достигали, на следующий год составляли основу группы перезимовавших), отловленных в разные времена года. Для гистологической обработки был отобран мозг 5 полевок, отловленных осенью (возраст 1–3 мес.), 5 — добытых зимой (5–7 мес.) и 5 перезимовавших полевок, отловленных следующим летом (9–11 мес.).

Мозг, фиксированный в 10%-м нормальном формалине, промывали в воде в течение 24 ч, затем фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин по стандартной методике (температура плавления заливочного парафина 56°C). Чтобы уменьшить ошибки из-за вариабельности толщины срезов, в один блок заливали одновременно материал из трех сезонно-возрастных выборок (один над другим). Из парафиновых блоков готовили серийные фронтальные срезы толщиной 20 мкм. Каждый пятый срез с помощью тонкого слоя белка с глицерином наклеивали на предметное стекло. На каждое стекло наклеивали три среза и окрашивали по Нисслю.

Для того, чтобы анализ микроструктуры мозга на серийных фронтальных срезах проводился в одном и том же участке гиппокампальной формации, был выбран морфологический маркер. По мере продвижения от фронтального полюса переднего мозга к каудальному наступает момент, когда зубчатая фасция из разомкнутой структуры на срезе превращается в замкнутую овальную структуру (рисунок). Именно эти первые срезы каудальной части переднего мозга, на которых зубчатая фасция принимала вид овала, использовались для количественного морфометрического исследования.



Рисунок. Фронтальный срез каудальной части переднего мозга рыжей полевки. Морфометрический анализ проводился в данном участке гиппокампальной формации.

Гистологические срезы головного мозга микроскопировали с помощью микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 25$ и посредством видеокамеры передавали на компьютер. Измерения площадей анализируемых структур осуществляли в ручном и автоматическом режимах. Автоматическую морфометрию осуществ-

ляли с помощью программного обеспечения KS 300 v.2,0 (Kontron Imaging System, Германия). Были стандартизированы параметры съемки и преобразования изображений: установлен размер изображения, уровень яркости, контрастности, границ гистограмм серого.

Измеряли профильное поле пирамидных клеток гиппокампа (поле CA3), площадь белого вещества гиппокампа (мшистые волокна), профильное поле гранулярных клеток зубчатой фасции, площадь молекулярного слоя зубчатой фасции. Наружный контур зубчатой фасции (FD, *fascia dentata*), образованный неокрашенным молекулярным слоем, обводили в ручном режиме и определяли общую площадь FD и гиппокампа. Окрашенные клеточные поля (гранулярные клетки FD и пирамидные клетки гиппокампа) измеряли в автоматическом режиме. Площадь волокон гиппокампа получали путем вычитания из полной площади овала, образованного гранулярными клетками FD (измеряли в автоматическом режиме), площади непосредственно гранулярных клеток, а также площади пирамидных клеток гиппокампа.

Для статистической оценки достоверности различий признаков использовали *t*-критерий Стьюдента (при сравнении данных, характеризующихся нормальным распределением в выборках).

Результаты и обсуждение

Животных сравнивали на трех этапах жизненного цикла — до зимней регрессии массы мозга и гиппокампа, в момент зимней регрессии и после весеннего «скачка роста». Средняя масса мозга осенних полевок уменьшилась с октября ($536 \pm 5,3$ мг) по февраль ($496 \pm 6,3$ мг) на 7,5% ($p < 0,05$) и увеличилась к июню ($546 \pm 6,4$ мг) на 10,1% ($p < 0,05$). Масса тела в осенней и зимней выборках достоверно не различалась (14,0–14,5 г), после весеннего «скачка роста» она была выше (20,8 г) на 46% ($p < 0,05$).

Полученные результаты, характеризующие сезонно-возрастную динамику размеров изученных отделов гиппокампальной формации, представлены в таблице. В зимний период происходило уменьшение обоих рассмотренных отделов гиппокампальной формации, уменьшалось профильное поле фронтального сечения как зубчатой фасции, так и поля СА3 гиппокампа. В зимней выборке площадь среза как зубчатой извилины, так и поля СА3 гиппокампа была достоверно меньше ($p < 0,05$), чем в осенней. Нельзя говорить о преимущественном уменьшении в зимний период одного из двух основных компонентов гиппокампа — клеточного слоя либо слоя волокон. Близкой по величине зимней регрессией характеризовались все изученные отделы гиппокампального комплекса — молекулярный и гранулярный слои зубчатой извилины, слои пирамидных клеток и волокон поля СА3 гиппокампа.

В весенний период у полевок в возрасте 6–10 мес. произошло увеличение отделов гиппокампальной формации. Прирост площади слоев зубчатой извилины был примерно одинаков. В поле СА3 гиппокампа отмечено заметно большее весеннее увеличение клеточного компонента (+27,3%) по сравнению с увеличением профильного поля волокон (+5,3%).

Полученные данные характеризуют сезонно-возрастные изменения размеров и структуры гиппокампального комплекса рыжих полевок. Данные по весеннему приросту площади срезов гиппокампа и зубчатой фасции свидетельствуют о процессах роста этих отделов головного мозга в позднем постнатальном онтогенезе. Полученные в работе результаты морфометрических исследований гистологических препаратов, характеризующие сезонно-возрастную изменчивость гиппокампального комплекса, в целом сходны с динамикой, выявленной ранее другими (макрорморфологическими) методами [6]. Сходная картина сезонной динамики результатов морфометрии серийных гистологических препаратов гиппокампа и массы гиппокампа была отмечена также у обыкновенных бурозубок [7].

Сезонные различия в анатомии гиппокампа

разных видов грызунов отмечены в ряде работ [3, 6, 14–19]. Выявлена сезонная изменчивость размера зубчатой извилины в природной популяции земляной белки Ричардсона (*Urocitellus richardsonii*) [19].

Сезонная изменчивость гиппокампа, вероятно, обусловлена несколькими механизмами. С возрастом содержание воды как во всем организме, так и в головном мозге понижается. Зимнее снижение содержания воды в организме животных и, в частности, в мозге и гиппокампе может указывать на снижение интенсивности процессов жизнедеятельности. Зимнее уменьшение мозга рыжих полевок обусловлено как понижением содержания в нем воды, так и уменьшением сухой массы мозга [3, 6]. В период весеннего «скачка роста» у перезимовавших полевок сухая масса мозга увеличивалась на 10%, абсолютная масса воды в мозге — на 14%. Соответственно, весной увеличивалась гидратация нервной ткани. Таким образом, зимнее понижение содержания воды в мозге было обусловлено одновременно возрастными и сезонными (обратимыми) факторами [3].

Длительное время считалось, что птицы и млекопитающие имеют постмитотичный мозг и число нервных клеток после рождения не увеличивается. Однако гиппокампальный нейрогенез был отмечен у взрослых особей животных различных групп [20, 21]. Исследования клеточной пролиферации и апоптозов у обыкновенной (*Sorex araneus*) и малой (*S. minutus*) бурозубок выявили, что, за исключением двух структур — зубчатой фасции и перивентрикулярной зоны, в которых происходил обмен клеток — популяция клеток мозга стабильна в течение жизненного цикла, несмотря на большие осцилляции объема мозга этих животных [8]. Исследования сезонной изменчивости микроскопического строения гиппокампа у обыкновенной бурозубки не выявило статистически значимых различий по количеству нервных клеток на единицу среза зубчатой фасции в сезонных выборках [7]. С другой стороны, было отмечено увеличение ширины среза зубчатой фасции от зимы к лету, что косвенно может подтверждать существование нейрогенеза в этом отделе мозга обыкновенных бурозубок. Изучение сезонно-возрастной изменчивости диаметра гранулярных клеток зубчатой фасции этих животных выявило уменьшение этого показателя зимой и новое увеличение весной [7].

Увеличение числа нейронов в единице площади среза отделов переднего мозга рыжих полевок в зимний период [4] может свидетельствовать о сокращении межклеточного пространства. Поскольку объем нервных клеток также уменьшался в этот период, вопрос о соотносительной роли изменений объема клеточных элементов и межкле-

точного пространства в сезонной изменчивости нервных структур остается открытым.

Данные по сезонной изменчивости числа клеток в гиппокампе противоречивы. Первоначально было показано, что клеточные популяции мозга землероек *S. araneus* и *S. minutus* стабильны в период сезонных колебаний размера мозга [8]. Из этого следует, что другие признаки, такие как размер тела клетки или объем нейропила, должны измениться. По данным с использованием других стереологических методов число клеток также было стабильным в большинстве исследованных структур за исключением неокортекса, в котором число клеток от лета к зиме понизилось на 25%, и гиппокампа – снижение на 30% [22]. Измерения проводились с использованием стереологических методов в сериях срезов, окрашенных по Нисслию. Объем исследуемых структур (измеренный с использованием принципа Кавальери) изменялся по-разному в различных структурах. Наибольшее сокращение объема от лета до зимы наблюдалось в базальных ганглиях (29,8%) и неокортексе (27,5%). Средний размер клеток у зимующих животных был на 20% меньше, чем у молодых, отловленных летом. Уменьшение размера тела клетки, по-видимому, коррелирует с изменениями общего объема структуры. Это означает, что объем тел нейрональных клеток является одним из важных факторов, обуславливающих сезонные изменения объема мозга у обыкновенных землероек [22].

Тот факт, что после рождения начинается гибель нервных клеток, также свидетельствует в пользу того, что увеличение мозга в постнатальном периоде происходит за счет роста клеток, которые существуют уже при рождении. Вероятно, что и сезонные обратимые изменения размера мозга и гиппокампа обусловлены преимущественно изменением не числа клеток, а их размеров, зависящих в свою очередь от их функционального состояния.

Структурные изменения головного мозга, вероятно, переключаются фотопериодом, динамика массы мозга в популяциях полевков (при коррекции по массе тела) практически полностью совпадает с сезонной динамикой длины светового дня [3, 4]. Это косвенно подтверждается экспериментальными данными: в лаборатории самцы пенсильванских полевков (*Microtus pennsylvanicus*), выращенные при летнем фотопериоде (14-часовой световой день), обладали более тяжелым мозгом, чем самцы, выращенные при зимнем фотопериоде (10-часовой световой день) [23].

Показано наличие взаимосвязи между объемом гиппокампа и уровнем половых гормонов у пенсильванских полевков (*Microtus pennsylvanicus*) в условиях экспериментальной колонии: самцы с высоким уровнем тестостерона, как и самки с высоким уровнем эстрадиола, отличались большим объемом гиппокампа [14]. Так как уровень половых гормонов закономерно изменяется по сезонам у грызунов и насекомых, можно предположить, что изменчивость гиппокампа тесно связана как с изменением уровня гормонов, так и с динамикой пространственного поведения, различающегося у полов.

Изменения мозга зависят как от активности физиологических процессов (что выражается, в частности, в динамике содержания воды), так и от микроморфологических изменений (изменения объема нервных клеток и волокон, процессов нейрогенеза и др.). Можно полагать, что, независимо от природы специфических тканевых или клеточных механизмов, динамика размера гиппокампа связана с изменением его функциональной активности. Например, его зимнее уменьшение и весеннее увеличение могут быть связаны, в частности, с изменением пространственного поведения, его депрессией зимой и активизацией весной.

Все изученные отделы гиппокамповой формации осенних рыжих полевков (в %, НП – неполовозрелые, ПР – половозрелые размножающиеся, * – $p < 0,05$)

Таблица
Сезонно-возрастные изменения площади профильного поля отделов гиппокамповой формации осенних рыжих полевков (в %, НП – неполовозрелые, ПР – половозрелые размножающиеся, * – $p < 0,05$)

Отдел гиппокамповой формации	Осень, НП → Зима, НП	Зима, НП → Лето, ПР
Зубчатая фасция и поле СА3 гиппокампа	- 12,8*	+ 16,3*
Зубчатая фасция	- 12,4*	+ 21,0*
Гранулярный слой зубчатой фасции	- 9,4	+ 22,4*
Молекулярный слой зубчатой фасции	- 13,3*	+ 20,5*
Поле СА3 гиппокампа	- 13,1*	+ 7,7
Пирамидные клетки поля СА3 гиппокампа	- 13,2*	+ 27,3*
Волокна поля СА3 гиппокампа	- 13,1*	+ 5,3

ских тканевых или клеточных механизмов, динамика размера гиппокампа связана с изменением его функциональной активности. Например, его зимнее уменьшение и весеннее увеличение могут быть связаны, в частности, с изменением пространственного поведения, его депрессией зимой и активизацией весной.

Все изученные отделы гиппокамповой формации

магии проявляют значительную морфологическую пластичность. Наблюдается рост отделов гиппокампа в позднем постнатальном онтогенезе у перезимовавших полевок (в период, когда происходит увеличение индивидуальных участков животных). Факты сезонной дегенерации и возобновления роста гиппокампа примечательны чрезвычайно высокой скоростью наблюдаемых морфологических изменений и свидетельствуют о том, что гиппокамп может очень быстро реагировать на экологические стимулы. Как поведение, так и структуры мозга непосредственно его обуславливающие могут быть фенотипически пластичными в ответ на изменяющиеся требования

среды.

Автор благодарен сотруднику Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН Н.А. Ушаковой за помощь при компьютерной морфометрической обработке материала.

Работа выполнена в рамках темы госзадания «Изучение адаптаций позвоночных животных методами сравнительной и функциональной морфологии», ч. 2, номер ЦИТИС: АААА-А16-116021660071-1.

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dehnel A.* Studies on the genus *Sorex L.* // Ann. Univ. M. Curie-Sklod. 1949. Vol. 4. N 2. P. 18–102.
2. *Bielak T., Pucek Z.* Seasonal changes in the brain weight of the common shrew (*Sorex araneus araneus* Linnaeus, 1758) // Acta Theriol. 1960. Vol. 3. N 13. P. 297–300.
3. *Yaskin V.A.* Seasonal changes in brain morphology in small mammals // Winter ecology of small mammals. Special Publication N 10 / Ed. J.F. Merritt. Pittsburgh: Carnegie Museum of Natural History, 1984. P. 183–191.
4. *Яскин В.А.* Сезонные изменения размеров головного мозга и черепа мелких млекопитающих // Журн. общ. биол. 1989. Т. 50. № 4. С. 470–480.
5. *Yaskin V.A.* Variation in brain morphology of the common shrew // Advances in biology of shrews. Special Publication N 18 / Eds. J.F. Merritt, G.L. Kirkland, and R.K. Rose. Pittsburgh: Carnegie Museum of Natural History, 1994. P. 155–161.
6. *Yaskin V.A.* Seasonal modulation of sex-related differences in hippocampus size and spatial behavior in bank voles, *Clethrionomys glareolus* (Rodentia, Cricetidae) // Russ. J. Ecol. 2013. Vol. 44. N 3. P. 221–226.
7. *Yaskin V.A.* The annual cycle of spatial behavior and hippocampal volume in *Sorex* // Advances in the biology of shrews II / Ed. J.F. Merritt, S. Churchfield, R. Hutterer, and B.I. Sheftel. N.Y.: International Society of Shrew Biologists, 2005. P. 373–385.
8. *Bartkowska K., Djavadian R.L., Taylor J.R.E., Turlejski K.* Generation recruitment and death of brain cells throughout the life cycle of *Sorex* shrews (Lypotyphla) // Eur. J. Neurosci. 2008. Vol. 27. N 7. P. 1710–1721.
9. *Lázaro J., Hertel M., Sherwood C.C., Muturi M., Dechmann D.K.N.* Profound seasonal changes in brain size and architecture in the common shrew // Brain Struct. Funct. 2018. Vol. 223. N 6. P. 2823–2840.
10. *O’Keefe J., Nadel L.* The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Clarendon Press, 1978. 230 pp.
11. *Lebedev I.V., Bezryadnov D.V., Deacon R.M.J., Kuptsov P.A., Malygin V.M., Pleskacheva M.G.* The effect of caudal hippocampus lesions in a Morris water maze in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) // Biol. Bull. 2013. Vol. 40. N. 2. P. 179–186.
12. *Яскин В.А.* Изменение архитектоники некоторых отделов переднего мозга в зимний период у рыжей полевки // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1998. № 3. С. 33–38.
13. *Тупикова Н.В., Сидорова Г.А., Коновалова Э.А.* Определитель возраста лесных полевок // Фауна и экология грызунов. № 9. М.: Изд. МГУ, 1970. С. 160–167.
14. *Galea L.A.M., Perrot-Sinal T.S., Kavaliers M., Ossenkopp K.P.* Relations of hippocampal volume and dentate gyrus width to gonadal hormone levels in male and female meadow voles // Brain Res. 1999. Vol. 821. N 2. P. 383–391.
15. *Lavenex P., Steele M.A., Jacobs L.F.* The seasonal pattern of cell proliferation and neuron number in the dentate gyrus of wild adult eastern grey squirrels // Eur. J. Neurosci. 2000. Vol. 12. N 2. P. 643–648.
16. *Workman J.L., Bowers S.L., Nelson R.J.* Enrichment and photoperiod interact to affect spatial learning and hippocampal dendritic morphology in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) // Eur. J. Neurosci. 2009. Vol. 29. N 1. P. 161–170.
17. *Workman J.L., Manny N., Walton J.C., Nelson R.J.* Short day length alter stress and depressive-like responses, and hippocampal morphology in Siberian hamsters // Horm. Behav. 2011. Vol. 60. N 5. P. 520–528.
18. *Burger D.K., Saucier J.M., Iwaniuk A.N., Saucier*

D.M. Seasonal and sex differences in the hippocampus of a wild rodents // *Behav. Brain Res.* 2013. Vol. 236. P. 131–138.

19. *Burger D.K., Gulbrandsen T., Saucier D.M., Iwaniuk A.N.* The effects of season and sex on dentate gyrus size and neurogenesis in a wild rodent, Richardson's ground squirrel (*Urocitellus richardsonii*) // *Neuroscience*. 2014. Vol. 272. P. 240–251.

20. *van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H.* Functional neurogenesis in the adult hippocampus // *Nature*. 2002. Vol. 415. N 6875. P. 1030–1034.

21. *Amrein I., Isler K., Lipp H.-P.* Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage // *Eur. J. Neurosci.* 2011. Vol. 34. N 6. P. 978–

987.

22. *Turlejski K., Michalski A., Bartkowska K., Shchipanov N.A., Tumasian F., Taylor J., Djavadian R.* New data on brain mechanisms of the Dehnel effect and age-dependent behavior in *Sorex araneus* // *Advances in Biology of Shrews III. Materials of the International conference.* Moscow: KMK, 2010. P. 69–70.

23. *Dark J., Spears N., Whaling C.S., Wade G.N., Meyer J.S., Zucker I.* Long day lengths promote brain growth in meadow voles // *Develop. Brain Res.* 1990. Vol. 53. N 2. P. 264–269.

Поступила в редакцию 31.01.2019 г.

После доработки 18.04.2019 г.

Принята в печать 23.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SEASONAL VARIABILITY OF THE HIPPOCAMPUS ARCHITECTONICS IN BANK VOLE (*CLETHRIONOMYS GLAREOLUS*, RODENTIA)

V.A. Yaskin

Department of Vertebrate Zoology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiyegory 1–12, Moscow, 119134, Russia
e-mail: yaskin_v@mail.ru

The seasonal and age variability of the hippocampus of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) from the natural population (Moscow region) was traced. The animals of the autumn generation were compared at three stages of the life cycle: in the fall (1–3 months old), during the winter decrease in brain mass (5–7 months), after the spring «growth spurt» (9–11 months). The winter sample differed statistically significantly smaller ($p < 0,05$) section area of both the dentate gyrus and the CA3 field of the hippocampus. All the studied divisions of the hippocampal complex – molecular and granular layers of the dentate gyrus, layers of pyramidal cells and fibers of the CA3 field of the hippocampus were characterized by a similar winter decrease (9,4–13,3%). In spring, there was a regrowth in all parts of the hippocampal complex. In the summertime in overwintered voles, the size of the hippocampal divisions was larger than that in the winter sample by 5,4–27,3%. The results indicate a significant morphological plasticity of the main structural components of the hippocampus due to the influence of seasonal factors in non-winter-sleeping rodents.

Keywords: *hippocampus, dentate gyrus, architectonics, morphological plasticity, seasonal variability, bank vole*

Сведения об авторе

Яскин Владимир Александрович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-45-78; e-mail: yaskin_v@mail.ru

ОБЗОР

УДК 616.31-006.03

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТВОРА КАРНУА И ЕГО МОДИФИКАЦИЙ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА РЕЦИДИВОВ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО УДАЛЕНИЯ КЕРАТОКИСТОЗНЫХ ОДОНТОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ И АМЕЛОБЛАСТОМ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

В.В. Лебедев*, С.Б. Буцан

*Отделение челюстно-лицевой хирургии, Центральный научно-исследовательский институт
стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Россия, 119021, г. Москва, ул.
Тимура Фрунзе, д. 16.
e-mail: lebedev100@bk.ru

Систематический обзор данных об использовании фармацевтической субстанции — раствора Карнуа — для уменьшения количества рецидивов таких новообразований, как кератокистозная одонтогенная опухоль и амелобластома. Это доброкачественные, но тем не менее агрессивные опухоли челюстей, имеющие высокий процент рецидивов (до 60–80%). Хирургическое лечение вышеописанных образований может выполняться с помощью: 1) марсупиализации (частота рецидивов до 24,8%); 2) энуклеации с дополнительной терапией или без нее; терапия может включать в себя криотерапию жидким азотом (частота рецидивов до 23,1%), периферическую остэктомию (частота рецидивов до 20%), обработку костной полости раствором Карнуа (частота рецидивов до 6,6%); 3) краевой/сегментарной резекции челюсти (частота рецидивов до 2,5%). Несмотря на низкий процент рецидивов при использовании краевой/сегментарной резекции, этот метод требует более длительного и дорогого анестезиологического и хирургического вмешательства, а также более продолжительного послеоперационного и реабилитационного периодов. С применением раствора Карнуа удалось снизить риски развития рецидивов кератокистозных одонтогенных опухолей и амелобластом с 60–80% до 6,6–11,5%. На сегодняшний день в мире применяется не только раствор Карнуа, рекомендованный Катлером и Золлингером в 1933 г., но и его модификации, не уступающие оригинальной субстанции по эффективности удаления оставшихся кистозных клеток. Безопасность использования раствора вблизи сосудов и нервов подтверждается работами ряда авторов. Несмотря на большое количество хирургических видов лечения как кератокистозных одонтогенных опухолей, так и амелобластом, применение энуклеации с использованием раствора Карнуа является оптимальным методом выбора при данных заболеваниях.

Ключевые слова: *кератокистозная одонтогенная опухоль, амелобластома, раствор Карнуа, рецидив, хирургическое лечение, энуклеация*

Оглавление

Кератокистозная одонтогенная опухоль.....	136
Амелобластома.....	137
Раствор Карнуа.....	138
Влияние раствора Карнуа на сосудистую стенку артерий и вен.....	139
Влияние раствора Карнуа на нижний альвеолярный нерв.....	139
Методы лечения кератокистозных одонтогенных опухолей и амелобластом.....	139
Сравнение результатов лечения кератокистозной одонтогенной опухоли и амелобластомы с использованием раствора Карнуа или без него.....	141
Заключение.....	141
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	142

Кератокистозная одонтогенная опухоль

Термин «одонтогенная кератокиста» впервые был введен Филипсеном в 1956 г. [1]. Согласно новой классификации ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения) от 2005 г., одонтогенная кератокиста переименована в кератокистозную одонтогенную опухоль (keratocystic odontogenic tumor – КСОТ) из-за ряда особенностей, которые отражают ее неопластический характер [2, 3]. В некоторых случаях КСОТ может подвергаться злокачественной трансформации – в частности, в плоскоклеточную карциному [4].

В этой связи особый интерес представляет **синдром Горлина-Гольца**, другие названия – синдром наследственного первично-множественного базальноклеточного рака, синдром базальноклеточного невуса (nevroid basal cell carcinoma syndrome – NBCCS), невобазоцеллюлярный синдром, наследственно-семейная эктомезодермальная аномалия, невоидная базальноклеточная карцинома. Синдром является аутосомно-доминантным наследственным заболеванием с высокой пенетрантностью (примерно 76%), характеризующимся наличием нескольких одонтогенных кератокист, а также различными кожными, стоматологическими, костными, офтальмологическими и неврологическими аномалиями органов [5, 6]. Это заболевание обусловлено мутацией гена-супрессора опухолевого роста *PTCH1* в сегментах хромосомы 9q22.3-q31 [7].

В патогенезе синдрома Горлина-Гольца важную роль играет нарушение обмена витамина D. Характерным признаком заболевания является высокий уровень гормона паращитовидной железы, сывороточного кальция и низкий – витамина D, что во многом определяет патогенез и клиническую картину [8]. Синдром практически одинаково распространен как у мужчин, так и у женщин. Ранняя диагностика имеет важное значение, поскольку заболевание может прогрессировать до более агрессивных форм базальноклеточных новообразований. По данным литературы, количество пациентов с множественными базалиомами составляет 10–21% от общего числа больных с базальноклеточным раком кожи [9, 10]. Наличие множественных КСОТ на верхней и нижней челюстях в большинстве случаев свидетельствует о наличии синдрома базальноклеточного невуса, требующего проведения ряда соответствующих (в

том числе и клинических) процедур. На полученной нами ортопантограмме (ОПТГ) визуализируются КСОТ, расположенные как на верхней, так и на нижней челюсти (рис. 1).

В большинстве случаев КСОТ является доброкачественной опухолью – моно- или поликистозной внутрикостной. Ее оболочка имеет орто- или паракератозную гистологическую форму (<http://p96542gr.beget.tech/libro/1675-Histological-Typing-of-Odontogenic-Tumours.html>). КСОТ возникает как «растяжение» базальных эпителиальных клеток вследствие дегенерации либо звездчатой сети, либо одонтогенных эпителиальных остатков на нижней или верхней челюсти. Эта опухоль влияет на опорную зону зубов, и частота ее составляет 2–11% от частоты возникновения всех кист челюстей [11].

Гистопатологический анализ помогает поставить окончательный диагноз. Эксцизионная биопсия или тонкоигольная аспирационная

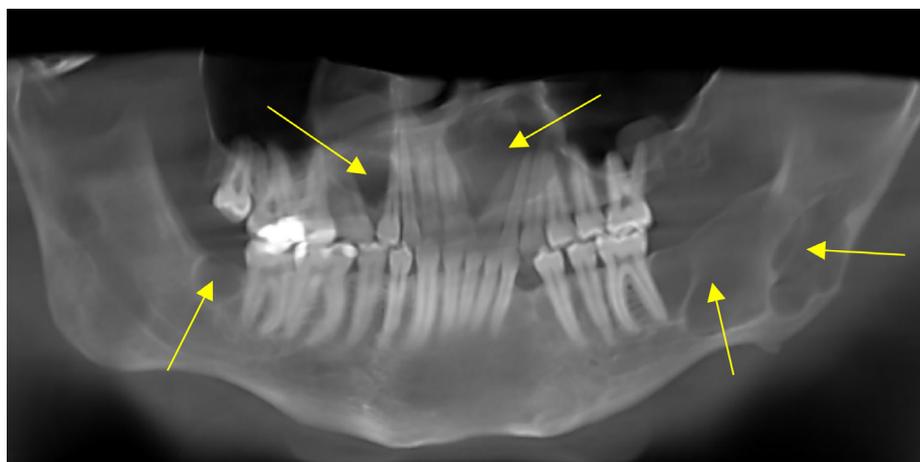


Рис. 1. Ортопантограмма пациента с синдромом Горлина-Гольца. Стрелками указаны множественные кисты верхней и нижней челюсти.

биопсия являются наиболее часто используемыми методами для получения образца опухоли. Правда, необходимо отметить, что в этом случае наличие воспалительного инфильтрата может изменить диагноз и привести к ложным результатам [3, 12].

Рентгенологически КСОТ выглядит как однокамерная или многокамерная с четко выраженным поражением, с фестончатыми краями [13]. Самое частое место нахождения опухоли – это область нижней челюсти (70–75%).

КСОТ чаще встречается у лиц мужского пола и диагностируется, как правило, в возрасте от 20 до 40 лет. Опухоль характеризуется высокой частотой рецидивов (до 60%) из-за остатков зубной пластинки, высокой митотической активности в базальном клеточном слое, рыхлой капсулы и недоступных участков, предотвращающих полное удаление оболочки, а также наличием дочерних

кист [14–16].

В первых исследованиях КСОТ сообщалось о частоте рецидивов до 62,5% [17], что стимулировало в последующие десятилетия разработку различных методов лечения КСОТ. Хирургическое лечение вышеописанного новообразования может выполняться с помощью [18]:

1. Марсупиализации (также называемой декompрессией или цистотомией).
2. Энуклеации с дополнительной терапией или без нее; терапия может включать в себя криотерапию жидким азотом, периферическую остеотомию, обработку костной полости раствором Карнуа.
3. Краевой/сегментарной резекции челюсти.

Амелобластома

Амелобластома – это доброкачественная одонтогенная опухоль эпителиального происхождения [19]. Актуальность ее изучения определяется способностью этой опухоли к позднему активному инфильтрирующему местнодеструктирующему росту, а также достаточно высокой вероятностью (от 50 до 70% в зависимости от гистологической формы амелобластомы) рецидива после хирургического вмешательства [20].

Амелобластома наиболее часто поражает нижнюю челюсть (тело и угол) – до 80% случаев [21, 22], альвеолярный отросток верхней челюсти подвергается поражению очень редко – около 6% случаев [23]. На рис. 2 приведена полученная нами компьютерная томография пациента с амелобластомой нижней челюсти.

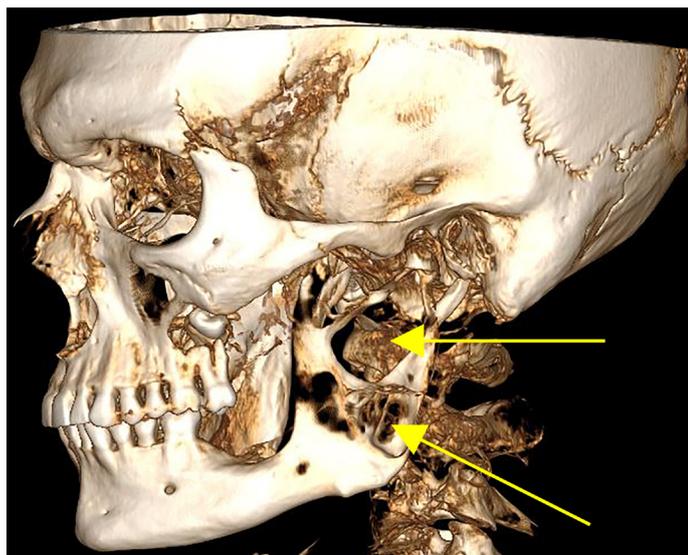


Рис. 2. Компьютерная томография пациента с амелобластомой, распространяющаяся на ветвь и угол нижней челюсти слева.

Рост этого новообразования медленный, а формирование клинической картины может про-

текать бессимптомно и безболезненно. Чаще всего амелобластома обнаруживается случайно при проведении компьютерной томографии черепа или ОПТГ по поводу другого клинического заболевания.

Выявляемые при проведении рентгенодиагностики проявления амелобластомы разнообразны и часто сходны с рентгенологической картиной, характерной для КСОТ, фолликулярных кист и различных форм фибром. Кроме того, они могут имитировать рентгенологическое изображение радикулярной кисты (сходной по строению с монокистозной амелобластомой). При рентгенологическом исследовании отмечаются округлые полости (единичные или множественные), отделенные друг от друга костными перегородками. Полости могут соприкасаться, накладываться и сливаться друг с другом. Тень опухоли неоднородна: в центре она более прозрачна, по периферии – менее. Контур очага поражения волнистый («фестончатый») – наблюдается симптом «мыльных пузырей» из-за неравномерной резорбции кости [24]. Подтвердить клинический диагноз и рентгенологическую картину амелобластомы может только патогистологическое исследование.

Амелобластома состоит из тяжей или островков одонтогенного эпителия, окруженных соединительнотканной стромой. Пролиферирующий эпителий может образовывать кисты. Цитоплазма эпителиоцитов вакуолизирована, для ядер характерна гиперхромность, они располагаются рядами, причем ближе к апикальному краю клеток, чем к базальной мембране (обратная поляризация) [25]. На сегодняшний день этиология амелобластом остается неясной. Одни утверждают, что в развитии опухоли участвуют островки Малассе, другие – что это базальные клетки слизистой оболочки полости рта [26, 27].

Макроскопически выделяют солидную и поликистозную амелобластома. В зависимости от происхождения и клинико-патологических характеристик амелобластомы подразделяются на монокистозные и периферические/внекостные.

Более детальная классификация, предложенная американскими стоматологами [28], включает следующие гистологические типы амелобластом: плексиформный, фолликулярный, акантоматозный, зернистоклеточный, десмопластический, базальноклеточный, монокистозный, периферический (<https://healthjade.com/ameloblastoma>). Частота встречаемости каждого из типов амелобластом разная (рис. 3) [28].

Механизмы, лежащие в основе инвазии и агрессивного развития одонтогенных новообразований, непрерывно изучаются [29, 30]. Исследование скорости клеточной пролиферации, которая оценивается по экспрессии ядерного белка

Ki-67, а также активности матриксных металлопротеиназ, способных разрушать различные компоненты внеклеточного матрикса, усиливающих опухолевый рост, инвазию и метастазирование клеток, может раскрыть механизмы агрессивного течения амелобластом.

для фолликулярного или плексиформного варианта рекомендуют 0,5 см, зернистоклеточного — 0,75 см, десмопластического — до 1,0 см, а для монокистозного, при котором может отмечаться инфильтрация на глубину до 0,25 см в костную ткань, показана периферическая остэктомия.



Рис. 3. Частота встречаемости гистологических типов амелобластом (по данным [28]).

Лечение амелобластом предусматривает их радикальное удаление в пределах здоровых тканей в виде энуклеации. Такое удаление выполняется, когда амелобластома распространяется в окружающие мягкие ткани. В связи с высоким процентом рецидивирования этой опухоли чаще всего применяются такие виды оперативных вмешательств, как маргинальная или сегментарная резекция челюсти с одномоментным устранением образовавшегося дефекта силовой титановой пластиной или костным ауто трансплантатом. В случае нерадикального удаления амелобластомы возможны рецидивы и прорастание опухоли в ауто трансплантат. Такое нерадикальное удаление опухоли и ее рецидив могут спровоцировать малигнизацию с развитием злокачественной амелобластомы, формирующейся из эпителиоцитов опухоли, или амелобластической фибросаркомы, в которой малигнизируется ее мезодермальный компонент.

По данным, которые приводит Е.Н. Кириченко [31], разные гистологические варианты амелобластом характеризуются различной глубиной прорастания опухолевых элементов в костную ткань. Таким образом, при проведении резекции по случаю амелобластомы для каждого гистологического варианта определяют максимально возможные размеры удаляемой здоровой кости. Так,

Наблюдение за прооперированными пациентами по поводу амелобластомы осуществляется регулярно — на протяжении пяти последующих лет — ввиду частого рецидивирования. В течение первого года период между рентгеновскими исследованиями составляет 6 мес., потом — в течение 3-летнего периода — пациенты обследуются ежегодно [32].

Раствор Карнуа

Одним из вариантов хирургического лечения КСОТ и амелобластом является энуклеация с использованием химических агентов или их комбинаций — например, раствора Карнуа. С применением раствора Карнуа удалось снизить риски развития рецидивов КСОТ и амелобластом с 60–80% до 1–10% [33, 34].

Раствор Карнуа впервые использовался в качестве лекарственного средства в работах Катлера и Золлингера еще в 1933 г. [35]. Это мощный фиксирующий, гемостатический и прижигающий агент, который проникает в губчатые пространства кости (средняя глубина проникновения составляет примерно 1,54 мм за 5 мин после воздействия на костную ткань) и удаляет оставшиеся клетки оболочки кистозного образования [36, 37]. В табл. 1 представлены данные о растворе Карнуа и его модификациях, применяющихся в настоя-

Таблица 1
Состав раствора Карнуа и его модификаций

Варианты субстанций	Состав субстанции	Ссылки
Состав I (рекомендован Катлером и Золлингером в 1933 г.)	Хлорид железа – 1 грамм Хлороформ – 3 мл Ледяная уксусная кислота – 1 мл Этиловый спирт 96% – 6 мл	[35]
Состав II	Этиловый спирт 96% – 3 мл Ледяная уксусная кислота – 1 мл	[38]
Состав III	Хлороформ – 3 мл Ледяная уксусная кислота – 1 мл Этиловый спирт 96% – 6 мл	[39]
Состав IV	Хлорид железа – 1 грамм Ледяная уксусная кислота – 1 мл Этиловый спирт 96% – 6 мл	[38]

щее время.

В растворе Карнуа большинство авторов не используют хлороформ, так как он активизирует злокачественную трансформацию клеток и вызывает бесплодие [39]. Кроме того, хлороформ официально запрещен FDA (Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) на территории США.

Так как раствор Карнуа является неселективным фиксирующим агентом, то его влияние распространяется не только на опухолевые клетки, но и на окружающие ткани, в том числе на сосуды и нервы. Оценка воздействия фиксатора на сосудисто-нервные пучки является важной для диагностики течения послеоперационного периода и поздних осложнений.

Таблица 2
Результаты воздействия раствора Карнуа на сосудистую стенку артерий и вен у крыс в течение 2–10 мин (по данным [40])

Время воздействия раствора Карнуа на стенку артерий и вен	Результат
2 мин	Гиалинизация сосудистой стенки, отсутствие полного ее разрушения и образования тромбов
5 мин	
10 мин	Разрушение сосудистой стенки с развитием необратимой васкулопатии и фиброза, а также формирования тромбов

Влияние раствора Карнуа на сосудистую стенку артерий и вен

В одной из работ [40] изучали воздействие раствора Карнуа на сосудистую стенку вен и артерий у крыс. Время действия раствора на сосуды составляло от 2 до 10 мин (табл. 2).

Результаты показали, что сосудистая стенка артерий и вен повреждается при воздействии раствора Карнуа. Чем больше время воздействия раствора на сосудистую стенку, тем выше вероятность развития васкулопатий, пристеночных тромбов и фиброза. Таким образом, после проведения энуклеации кистозного образования время нахождения раствора Карнуа в костной полости не должно превышать 2–5 мин [40].

Влияние раствора Карнуа на нижний альвеолярный нерв

Достаточно часто хирурги сталкиваются с ситуацией, в которой нижний альвеолярный нерв располагается в полости кистозного образования. Не исключено, что использование раствора Карнуа как мощной прижигающей субстанции может повлечь за собой необратимые изменения в нерве с большим количеством осложнений.

В одной из работ [41] провели экспериментальные исследования воздействия раствора Карнуа на нервную ткань. Авторы использовали нижний альвеолярный нерв у кроликов. Время действия раствора на нерв составляло от 30 с до 10 мин (табл. 3). После проведенной общей анестезии у кроликов в область нижней губы был вставлен игольчатый электрод (стальной электрод с тефлоновым покрытием) для измерения импульсов от нижнего альвеолярного нерва. Запись и регистрацию импульсов проводили с помощью электромиографии.

Результаты эксперимента показывают, насколько агрессивен раствор Карнуа при воздействии на нервную ткань. Длительное применение раствора влечет за собой необратимые изменения в нервной ткани. В связи с этим безопасное использование раствора Карнуа рядом с нервом не должно превышать 2–3 мин [41].

Методы лечения КСОТ и амелобластом

Для лечения КСОТ и амелобластом применяются следующие методы лечения и их комбинации [18].

Марсупиализация (декомпрессия, цистотомия). Марсупиализация – это метод оперативного лечения кистозных образований, заключающийся во вскрытии новообразования, эвакуации его содержимого и циркулярном наложении узловых швов по периферии таким образом, чтобы соединить слизистую оболочку, надкостницу и стенку опухоли. Марсупиализация может быть осуществ-

Таблица 3
Результаты воздействия раствора Карнуа на нижний альвеолярный нерв у кроликов в течение 30 с – 10 мин (по данным [41])

Время воздействия раствора Карнуа на нижний альвеолярный нерв	Результат
30 с	Зона воздействия раствора ограничивается внешней оболочкой нерва – эпилеврием
1 мин	
2 мин	
3 мин	Зона воздействия раствора распространяется на эпилеврий, а также на эндоневрий без разрушения структуры нервной ткани
5 мин	Полное и необратимое разрушение структуры нервной ткани
10 мин	

влена в один или два этапа. При одноэтапном способе опухоль вскрывают, освобождают ее от содержимого, иссекают избыток оболочки, после чего стенки новообразования подшивают к краям раны, а затем в полость вводят марлевые тампоны и дренажную трубку. При двухэтапном способе после подшивания к краям раны опухоль не вскрывается и только через 7–10 сут после сращения стенок новообразования с краями раны ее опорожняют и дренируют. Так происходит снижение внутрикостного давления с последующей активацией процессов регенерации костной ткани. Данная методика относительно проста, в ней минимальны осложнения, но довольно высок риск развития рецидивов из-за неполного удаления оболочки опухоли [42–44].

Марсупиализация + энуклеация с применением дополнительной терапии или без нее. Методика отличается от классической марсупиализации дополнительным удалением оболочки с применением дополнительной терапии или без нее. В качестве терапии чаще всего используют йодоформную турунду (марля, пропитанная йодоформом) с целью выжигания остаточных опухолевых клеток. Данный способ имеет более частое применение в клинической практике, нежели классическая методика. Этот метод способствует более низкой частоте возникновения рецидивов данных новообразований [45].

Энуклеация. Энуклеация – это полное удаление оболочки кистозного образования. В связи с тонкостью и рыхлостью оболочки КСОТ или амелобластомы затруднено ее полное удаление. Из-за особенностей клеточного состава КСОТ и некоторых гистологических типов амелобластом остатки оболочки и мелкие периферические дочерние клетки остаются в пределах костной по-

лости. По этой причине энуклеация приводит к рецидивам с частотой до 26% [46, 47].

Энуклеация с периферической остэктомией. Дополнительное удаление по периферии костной ткани на 1–2 мм после элиминации кистозного образования не защищает от риска развития рецидива, частота которого при использовании данной методики составляет около 20% [48, 49]. В качестве визуализации остатков оболочки новообразования для полного их удаления некоторые авторы используют метиленовый синий [50].

Энуклеация с криотерапией жидким азотом. После удаления оболочки новообразования костная полость подвергается обработке жидким азотом, температура которого составляет $-196,6^{\circ}\text{C}$ [51]. К сожалению, криотерапия приводит к образованию внутриклеточных и внеклеточных кристаллов льда, которые нарушают нормальный осмотический и электролитный баланс внутри клеток, что в конечном итоге вызывает их гибель [52]. После тщательной энуклеации жидкий азот наносят на стенки образовавшейся полости как минимум на 1 мин, пока полость не будет достаточно хорошо покрыта слоем льда. Исследования показали, что глубина проникновения жидкого азота в костную ткань составляет не менее 1,5 мм [50]. Эта субстанция очень агрессивна в отношении мягкотканых структур, сосудисто-нервных пучков и зубной ткани. В то же время, при применении криотерапии сохраняется неорганический костный матрикс, позволяющий улучшить восстановление костной ткани. Тем не менее, криотерапия жидким азотом вызывает ослабление архитектоники костной ткани, которое достигает максимума через 8 нед. после проведения данной процедуры. Из-за этого увеличивается риск патологического перелома челюсти [53]. Частота рецидивов после проведения этой методики составляет от 11% до 23% [18, 46].

Энуклеация с использованием раствора Карнуа и его модификаций. После проведенной энуклеации КСОТ или амелобластомы костная полость обрабатывается раствором Карнуа. Раствор проникает за 3–5 мин в губчатые пространства кости приблизительно на 1,54 мм, фиксируя и удаляя оставшиеся опухолевые клетки [47]. Обработка костной полости раствором Карнуа и его модификациями не должна превышать 2–3 мин из-за неспецифического воздействия данной субстанции на окружающие мягкие ткани и сосудисто-нервные пучки. После этого раствор активно вымывается из костной полости физиологическим раствором. Рецидивы кистозных образований при использовании этой методики составляют не более 6,6% [18], т.е. почти в два-три раза меньше, чем при применении вышеописанных методов.

Краевая/сегментарная резекция верхней/ниж-

ней челюсти в пределах здоровых тканей с одномоментным замещением образовавшегося дефекта костным аутотрансплантатом или силовой титановой пластиной. Из описанных выше методов лечения наиболее низким процентом возникновения рецидивов КСОТ и амелобластом характеризуется краевая/сегментарная резекция челюсти. Рецидивы при резекции челюстей составляют не более 2,5% [18, 54]. Несмотря на это, при данном методе лечения имеет место высокий процент инвалидизации пациентов. Одномоментное замещение образовавшегося дефекта костным аутотрансплантатом требует более длительного и дорогого анестезиологического и хирургического вмешательства, а также более продолжительного послеоперационного и реабилитационного периодов, чем при других видах лечения.

Сравнение результатов лечения КСОТ и амелобластомы с использованием раствора Карнуа или без него

За последние 20 лет появилось несколько тысяч публикаций, которые описывают различные подходы к лечению КСОТ и амелобластом. В частности, в одной из работ [18] авторы проанализировали около 7 тысяч статей и сопоставили подходы к лечению КСОТ и частоту рецидивов при каждом из использованных методов (рис. 4).

лечения амелобластом и КСОТ приводит к высоким цифрам развития рецидивов из-за неполного удаления оболочки новообразования.

В одной из работ [33] указывается на возможность снижения количества рецидивов амелобластом с 60–80% до 10–15% с помощью применения раствора Карнуа. В период с 2001 по 2014 гг. 26 пациентов с различными гистологическими формами амелобластом проходили хирургическое лечение в виде энуклеации с использованием раствора Карнуа. Период наблюдения после оперативного вмешательства составлял от 3 мес. до 12 лет. Частота возникновения рецидивов с использованием раствора Карнуа составила 11,5% (3 случая из 26).

Заключение

КСОТ и амелобластома – это доброкачественные, но тем не менее агрессивные образования, имеющие высокий процент рецидивов. На сегодняшний день существует множество хирургических и консервативных методов лечения этих новообразований. Применение обычной энуклеации после удаления КСОТ или амелобластомы не исключает, к сожалению, достаточно высокой вероятности сохранения части оболочки или периферических дочерних клеток новообразования в костной полости. Большое количество статей и



Рис. 4. Частота возникновения рецидивов при использовании различных методов лечения кератокистозной одонтогенной опухоли (по данным [18]).

Наиболее низкая вероятность развития рецидивов КСОТ характерна для краевой/сегментарной резекции челюсти. Столь радикальный подход к лечению несет за собой тяжелые нарушения функций органов, приводя к инвалидизации пациента. Использование марсупиализации как наиболее простого и менее радикального метода

обзоров [18, 33, 34] свидетельствуют о высокой эффективности использования раствора Карнуа в комбинации с хирургической энуклеацией. Внедрение в один из этапов хирургического лечения агрессивного кистозного образования раствора Карнуа и его модификаций снижает вероятность повторного появления заболевания с 60–80% до

6,6%. Данная методика не лишена недостатков, которые связаны в основном с повреждением сосудисто-нервных пучков. При использовании данного раствора хирург должен следить за состоянием окружающих тканей и топографо-анатомических областей расположения опухоли, а также размерами образования и наличием вблизи новообразования сосудисто-нервных пучков.

Весьма перспективным и эффективным методом лечения КСОТ является применение энуклеации с последующей обработкой костной полости жидким азотом [51]. Однако проникновение жидкого азота в костную ткань и разрушение оставшихся опухолевых клеток не гарантируют полного отсутствия рецидивов. Кроме того, данный метод дает больше осложнений, чем метод с использованием раствора Карнуа. Частота рецидивов при использовании жидкого азота в два раза (и даже более) выше, чем при применении раствора Карнуа и его модификаций.

Наиболее радикальным методом лечения КСОТ и агрессивных гистологических форм амелобластом является краевая/сегментарная резекция челюсти в пределах здоровых тканей. Частота рецидивов при использовании данной методики составляет не более 3% [18]. Выполнение таких оперативных вмешательств, безусловно, должно считаться одним из основных методов выбора.

Устранение образовавшегося дефекта осуществляется силовой титановой пластиной или костным аутоотрансплантатом (преимущество отдается ревааскуляризованному малоберцовому костному аутоотрансплантату). К сожалению, далеко не все пациенты могут претендовать на такой вид оперативного лечения. В частности, использование титановой пластины инвалидизирует человека (сохраняются эстетический и функциональный дефекты). Кроме того, этот метод требует более длительного и дорогого анестезиологического и хирургического вмешательства, а также более длительного послеоперационного периода и реабилитационного периодов, чем при других видах лечения.

Таким образом, энуклеация с использованием раствора Карнуа должна считаться методом оптимального выбора при лечении КСОТ и амелобластом ввиду своей простоты, дешевизны и высоких шансов сохранить целостность челюсти. Низкая частота рецидивов (до 6,6%) и безопасность применения являются главными критериями использования раствора Карнуа.

Все снимки сделаны с согласия пациентов и одобрены этической комиссией по биоэтике ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ». Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Philipsen H.P. On keratocysts in the jaws // *Tandlaegebladet*. 1956. Vol. 60. P. 963–980.
2. de Molon R.S., Verzola M.H., Pires L.C., Mascarenhas V.I., da Silva R.B., Cirelli J.A., Roberto H.B. Five years follow-up of a keratocyst odontogenic tumor treated by marsupialization and enucleation: a case report and literature review // *Contemp. Clin. Dent*. 2015. Vol. 6. Suppl. 1. P. 106–110.
3. Philipsen H.P. Keratocystic odontogenic tumour // *Pathology and genetics of head and neck tumours*. WHO classification of tumours, 3rd edition, vol. 9 / Eds. L. Barnes, J.W. Eveson, P. Reichart, D. Sidransky. Lyon: IARC, 2005. P. 306–307.
4. Robles P., Roa I. Keratocystic odontogenic tumor: Clinicopathological aspects and treatment // *J. Oral Res*. 2014. Vol. 3. N 4. P. 249–256.
5. Ljubenović M., Ljubenović D., Binić I., Jovanović D., Stanojević M. Gorlin-Goltz syndrome // *Acta Dermatoven. APA*. 2007. Vol. 16. N 4. P. 166–169.
6. Leger M., Quintana A., Tzu J., Yee H., Kamino H., Sanchez M. Nevoid basal cell carcinoma syndrome // *Dermatol. Online J*. 2011. Vol. 17. N 10. P. 23.
7. Soufir N., Gerard B., Portela M., Brice A., Liboutet M., Saiag P., Descamps V., Kerob D., Wolkenstein P., Gorin I., Lebbe C., Dupin N., Crickx B., Basset-Seguin N., Grandchamp B. PTCH mutations and deletions in patients with typical nevoid basal cell carcinoma syndrome and in patients with a suspected genetic predisposition to basal cell carcinoma: A French study // *Br. J. Canc*. 2006. Vol. 95. N 4. P. 548–553.
8. Tang J.Y., Wu A., Linos E., Parimi N., Lee W., Aszterbaum M., Asgari M.M., Bickers D.R., Epstein E.H. Jr. High prevalence of vitamin D deficiency in patients with basal cell nevus syndrome // *Arch. Dermatol*. 2010. Vol. 146. N 10. P. 1105–1110.
9. Пустынский И.Н., Кропотов М.А., Ткачев С.И., Пачес А.И., Алиева С.Б., Ягубов А.С., Бажутова Г.А., Сланина С.В. Лечение больных плоскоклеточным раком кожи головы и шеи // *Рос. онкол. ж.* 2013. N 1. С. 42–46.
10. Беренбейн Б.А., Лезвинская Е.М., Краснощекова Н.Ю., Ильинская Т.Б. Синдром Горлина-Гольца // *Вестн. дерматол.* 1993. N 5. С. 63–67.
11. Guimardes A.C., Santos M.D.D.C.F., de Carvalho G.M., Chone C.T., Pfeilsticker L.N. Giant keratocystic odontogenic tumor: three cases and literature review // *Iran. J. Otorhinolaryngol*. 2013. Vol. 25. N 73. P. 245–252.

12. *Stoelinga P.J.W.* Excision of the overlying, attached mucosa, in conjunction with cyst enucleation and treatment of the bony defect with Carnoy solution // *Oral. Maxillofac. Surg. Clin.* 2003. Vol. 15. N 3. P. 407–414.
13. *Mendes R.A., Carvalho J.F.C., van der Waal I.* Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relation to its histopathological and biological features // *Oral Oncol.* 2010. Vol. 46. N 4. P. 219–225.
14. *Yashoda Devi B.K., Rakesh N., Nisha A., Sagar P., Prasad K.* Bilateral keratocystic odontogenic tumor of mandible // *India. J. Multidiscip. Dent.* 2010. Vol. 1. N 1. P. 12–14.
15. *Matijević S., Damjanović Z., Cerović S.* Early reconstruction of bone defect created after initial surgery of a large keratocystic odontogenic tumor: A case report // *Vojnosanit. Pregl.* 2013. Vol. 70. N 8. P. 789–793.
16. *Jafaripozve N., Jafaripozve S., Khorasgani M.A.* Keratocyst odontogenic tumor: importance of selection the best treatment modality and a periodical follow-up to prevent from recurrence: a case report and literature review // *Int. J. Prev. Med.* 2013. Vol. 4. N 8. P. 967–970.
17. *Pindborg J.J., Hansen J.* Studies on odontogenic cyst epithelium: 2. Clinical and roentgenologic aspects of odontogenic keratocysts // *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Pathol.* 1963. Vol. 58. N 3. P. 283–294.
18. *Chrčanovic B.R., Gomez R.S.* Recurrence probability for keratocystic odontogenic tumors: An analysis of 6427 cases // *J. Cranio. Maxill. Surg.* 2017. Vol. 45. N 2. P. 244–251.
19. *Reichart P.A., Philipsen H.P., Sonner S.* Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases // *Eur. J. Canc. B Oral Oncol.* 1995. Vol. 31. N 2. P. 86–99.
20. *Семкин В.А., Григорьян А.С., Бабиченко И.И., Усачев Е.С., Зарецкая А.С.* Особенности хирургической тактики при различных формах амелобластических опухолей // *Стоматол.* 2012. Т. 91. N 4. С. 25–27.
21. *Junquera L., Ascani G., Vicente J.C., Garcia-Consuegra L., Roig P.* Ameloblastoma revisited // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2003. Vol. 112. N 12. P. 1034–1039.
22. *Juuri E., Isaksson C., Jussila M., Heikinheimo K., Thesleff I.* Expression of the stem cell marker, SOX 2, in ameloblastoma and dental epithelium // *Eur. J. Oral Sci.* 2013. Vol. 121. N 6. P. 509–516.
23. *Yang R., Liu Z., Peng C., Cao W., Ji T.* Maxillary ameloblastoma: Factors associated with risk of recurrence // *Head Neck.* 2017. Vol. 39. N 5. P. 996–1000.
24. *Семкин В.А., Бабиченко И.И., Усачев Е.С., Зарецкая А.С.* Клинико-морфологическая характеристика амелобластом // *Стоматол.* 2013. Т. 92. N 4. С. 40–43.
25. *Gardner D.G., Heikinheimo K., Shear M., Philipsen H.P., Coleman H.* Ameloblastomas // *Pathology and genetics of head and neck tumours. WHO classification of tumours, 3rd Edition, Vol. 9 / Eds. L. Barnes, J.W. Eveson, P. Reichart, D. Sidransky.* Lyon: IARC, 2005. P. 298–302.
26. *Luan X., Ito Y., Diekwisch T.G.H.* Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath // *Dev. Dynam.* 2006. Vol. 235. N 5. P. 1167–1180.
27. *Nam H., Kim J.H., Kim J.W., Seo B.M., Park J.C., Kim J.W., Lee G.* Establishment of Hertwig's epithelial root sheath/epithelial rests of Malassez cell line from human periodontium // *Mol. Cells.* 2014. Vol. 37. N 7. P. 562–567.
28. *Shaikhi K., Neiders M., Chen F., Aguirre A.* Morphological variants of ameloblastoma and their mimickers // *N. A. J. Med. Sci.* 2012. Vol. 5. N 1. P. 20–28.
29. *Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z.* Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007. Vol. 8. N 3. P. 221–233.
30. *Pinheiro J.J.V., Freitas V.M., Moretti A.I.S., Jorge A.G., Jaeger R.G.* Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity // *Histopathology.* 2004. Vol. 45. N 1. P. 65–72.
31. *Кириченко Е.Н.* Использование стереолитографического моделирования у пациентов с амелобластомой нижней челюсти // *Альм. соврем. науки и образ.* 2014. Т. 5–6. N 84. С. 78–82.
32. *Бабиченко И.И., Рыбальская В.Ф., Цимбалист Н.С., Семкин В.А.* Пролиферативная активность клеток опухоли и распределение SOX2+ плюрипотентных стволовых клеток в различных гистологических вариантах амелобластомы // *Арх. патол.* 2018. Т. 80. N 1. С. 21–26.
33. *Haq J., Siddiqui S., McGurk M.* Argument for the conservative management of mandibular ameloblastomas // *Brit. J. Oral Max. Surg.* 2016. Vol. 54. N 9. P. 1001–1005.
34. *Al-Moraissi E.A., Dahan A.A., Alwadeai M.S., Oginni F.O., Al-Jamali J.M., Alkhatari A.S., Al-Tairi N.H., Almaweri A.A., Al-Sanabani J.S.* What surgical treatment has the lowest recurrence rate following the management of keratocystic odontogenic tumor?: A large systematic review and meta-analysis // *J. Cranio Maxill. Surg.* 2017. Vol. 45. N 1. P. 131–144.
35. *Cutler E.C., Zollinger R.* The use of sclerosing solutions in the treatment of cysts and fistulae // *Am. J. Surg.* 1933. Vol. 19. N 3. P. 411–418.
36. *Pitak-Arnnop P., Chainé A., Oprean N., Dhanuthai K., Bertrand J.C., Bertolus C.* Management of odontogenic keratocysts of the jaws: A ten-year experience with 120 consecutive lesions // *J. Cranio*

Maxill. Surg. 2010. Vol. 38. N 5. P. 358–364.

37. Voorsmit R.A.C.A., Stoelinga P.J.W., van Haelst U.J.G.M. The management of keratocysts // J. Maxillofac. Surg. 1981. Vol. 9. P. 228–236.

38. Madhulaxmi M., Abdul Wahab P.U. Carnoy's solution as a surgical medicament in the treatment of KCOT // Int. J. Pharma Bio Sci. 2014. Vol. 5. N 1. P. 492–495.

39. Ecker J., ter Horst R., Koslovsky D. Current role of Carnoy's solution in treating keratocystic odontogenic tumors // J. Oral Maxillofac. Surg. 2016. Vol. 74. N 2. P. 278–282.

40. Saulacic N., Stajcic Z., Stajcic L.S., Piattelli A., Iizuka T., Lombardi T. Effects of Carnoy's solution on blood vessels of the axillary fossa of rats // Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2009. Vol. 38. N 8. P. 876–879.

41. Frerich B., Cornelius C.P., Wiethülter H. Critical time of exposure of the rabbit inferior alveolar nerve to Carnoy's solution // J. Oral Maxillofac. Surg. 1994. Vol. 52. N 6. P. 599–606.

42. Gao L., Wang X.L., Li S.M., Liu C.Y., Chen C., Li J.W., Yan X.J., Zhang J., Ren W.H., Zhi K.Q. Decompression as a treatment for odontogenic cystic lesions of the jaw // J. Oral Maxillofac. Surg. 2014. Vol. 72. N 2. P. 327–333.

43. Brundum N., Jensen V.J. Recurrence of keratocysts and decompression treatment: A long-term follow-up of forty-four cases // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1991. Vol. 72. N 3. P. 265–269.

44. Nakamura N., Mitsuyasu T., Mitsuyasu Y., Taketomi T., Higuchi Y., Ohishi M. Marsupialization for odontogenic keratocysts: Long-term follow-up analysis of the effects and changes in growth characteristics // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2002. Vol. 94. N 5. P. 543–553.

45. Афанасьев В.В. Хирургическая стоматология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 880 с.

46. Kaczmarzyk T., Mojsa I., Stypulkowska J. A systematic review of the recurrence rate for keratocystic odontogenic tumour in relation to treatment modalities // Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2012. Vol. 41. N 6. P. 756–767.

47. Johnson N.R., Batstone M.D., Savage N.W. Management and recurrence of keratocystic odontogenic tumor: a systematic review // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 2013. Vol. 116. N 4. P. 271–276.

48. Stoelinga P.J.W. The treatment of odontogenic keratocysts by excision of the overlying, attached mucosa, enucleation, and treatment of the bony defect with Carnoy solution // J. Oral Maxillofac. Surg. 2005. Vol. 63. N 11. P. 1662–1666.

49. Tolstunov L., Treasure T. Surgical treatment algorithm for odontogenic keratocyst: combined treatment of odontogenic keratocyst and mandibular defect with marsupialization, enucleation, iliac crest bone graft, and dental implants // J. Oral Maxillofac. Surg. 2008. Vol. 66. N 5. P. 1025–1036.

50. Pogrel M.A. The keratocystic odontogenic tumor // Oral Maxillofac. Surg. Clin. 2013. Vol. 25. N 1. P. 21–30.

51. Salmassy D.A., Pogrel M.A. Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions // J. Oral Maxillofac. Surg. 1995. Vol. 53. N 7. P. 784–790.

52. Tonietto L., Borges H.O.I., Martins C.A.M., Silva D.N., Filho M.S. Enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the treatment of keratocystic odontogenic tumors: a case series // J. Oral Maxillofac. Surg. 2011. Vol. 69. N 6. P. 112–117.

53. Schmidt B.L., Pogrel M.A. The use of enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts // J. Oral Maxillofac. Surg. 2001. Vol. 59. N 7. P. 720–725.

54. Kanoi A.V., Banerjee T., Sundaramurthy N., Sarkar A., Kanoi P., Saha S. Defining giant mandibular ameloblastomas – Is a separate clinical sub-entity warranted? // Indian J. Plast. Surg. 2018. Vol. 51. N 2. P. 208–215.

Поступила в редакцию 15.02.2019 г.

После доработки 04.05.2019 г.

Принята в печать 10.05.2019 г.

REVIEW

USE OF CARNOY'S SOLUTION AND ITS MODIFICATIONS FOR REDUCING THE NUMBER OF RECURRENCES AFTER SURGICAL REMOVAL OF KERATOCYSTIC ODONTOGENIC TUMORS AND AMELOBLASTOMAS: A SYSTEMATIC REVIEW

V.V. Lebedev*, S.B. Butsan

Department of Maxillofacial Surgery, Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery,
Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Timura Frunze 16, Moscow, 119021, Russia

*e-mail: lebedev100@bk.ru

The paper is a systematic review of use of the pharmaceutical substance – Carnoy’s solution – to reduce the number of recurrences of such tumors as keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. These are benign, but yet aggressive, jaw tumors with a high percentage of recurrences (up to 60–80%). Surgical treatment of the above-described formations can be performed using: 1) marsupialization (recurrence rate up to 24.8%); 2) enucleation with or without additional therapy; therapy may include cryotherapy with liquid nitrogen (recurrence rate up to 23.1%), peripheral ostectomy (recurrence rate up to 20%), bone cavity treatment with Carnoy’s solution (recurrence rate up to 6.6%); 3) marginal/segmental resection of the jaw (recurrence rate up to 2.5%). Despite of the low percentage of recurrences when using marginal/segmental resection, this method requires a longer and more expensive anesthetic and surgical intervention, as well as longer postoperative and rehabilitation periods. With the use of Carnoy’s solution, it became possible to reduce the risks of recurrence of keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas from 60–80% to 6.6–11.5%. Today, in all the world, not only Carnoy’s solution recommended by Cutler and Zollinger in 1933 is applied, but also its modifications which are not inferior to the original substance in terms of removal efficiency of the remaining cystic cells. The safety of the use of the solution near the vessels and nerves is confirmed by works of a number of authors. Despite of the large number of surgical treatments of both keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas, the use of enucleation with the use of Carnoy’s solution is the optimal method of choice for these diseases.

Keywords: *keratocystic odontogenic tumor, ameloblastoma, Carnoy’s solution, recurrence, surgical treatment, enucleation*

Сведения об авторах

Лебедев Валентин Витальевич – аспирант отделения челюстно-лицевой хирургии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ». Тел.: 8-499-246-13-34; e-mail: *lebedev100@bk.ru*.

Буцан Сергей Борисович – канд. мед. наук, зав. отделением челюстно-лицевой хирургии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Тел.: 8-499-246-13-34; e-mail: *sergeibutsan@hotmail.com*.

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 61:577.152.344

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS OCHRACEUS* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА X В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКАА.В. Орехова¹, А.А. Осмоловский^{1,*}, В.Г. Крейер¹, Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров²

¹Кафедра микробиологии, биологический факультет и ²Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы д. 1, стр. 12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Показано, что активность фактора X, определенная в нормальной плазме с помощью протеазы *Aspergillus ochraceus*, сравнима с активностью, оцениваемой при использовании коммерческого аналога – протеазы из яда гадюки Рассела (препарат RVV-X[®]). Выявлено, что протеаза *A. ochraceus* наряду с препаратом RVV-X[®] может быть применена для определения концентрации фактора X в плазме с его пониженным содержанием. Исследование активаторной по отношению к фактору X активности протеазы *A. ochraceus* показало, что она несколько выше по сравнению с активностью препарата из яда змеи. Это может сделать протеазу *A. ochraceus* перспективным заменителем змеиного активатора в диагностикумах для определения содержания фактора X.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, активаторы фактора X, диагностика фактора X, препарат RVV-X[®], протеазы аспергиллов, патологическая плазма

Фактор X – сериновая эндопротеаза, играющая одну из ключевых ролей в системе гемостаза. В процессе свертывания крови активированный фактор X является одним из компонентов протромбиназы, превращающей протромбин в тромбин [1]. При дефиците фактора X возникают экхимозы, петехиальные кровоизлияния, гематомы, продолжительные кровотечения из слизистых оболочек пищеварительного тракта [2]. В связи с этим стоит необходимость длительного мониторинга концентрации фактора X в плазме крови. Кроме того, динамический контроль уровня фактора X необходим при лечении низкомолекулярными гепаринами тромбоемболических осложнений, инфарктов и инсультов [3].

Для проведения диагностики содержания фактора X в кровотоке используют специфическую протеазу из яда гадюки Рассела *Daboia russellii* [4]. На ее основе был разработан препарат RVV-X[®] («Pentapharm», Швейцария). Инкубация фактора X с протеазой-активатором из яда *D. russellii* приводит в результате ограниченного протеолиза к превращению фактора X в его активную форму – активированный фактор X, который расщепляет специфический хромогенный пептидный субстрат Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765) по связи

аргинил-*n*-нитроанилид. Концентрация отщепившегося в результате реакции *n*-нитроанилина (pNA) прямо пропорциональна концентрации фактора X в образце [4].

Исследования последних лет показывают, что в качестве активаторов проферментов системы гемостаза, альтернативных змеиным, могут быть использованы протеазы, образуемые микромицетами [5]. Так, внеклеточные протеазы *Aspergillus ochraceus* могут активировать протеин C плазмы крови человека аналогично протеазе южноамериканского щитомордника, используемой в диагностике этого белка. Данные протеазы сопоставимы по активности и сходны по ряду свойств [6]. Наряду с активностью по отношению к протеину C, протеазы микромицета *A. ochraceus* обладают и активаторной по отношению к фактору X активностью, поэтому большой интерес представляет выявление возможности их применения для определения содержания фактора X в плазме крови наряду с протеазой препарата RVV-X[®]. Поскольку к настоящему времени неактивный рекомбинантный фермент из яда гадюки получить не удалось, использование альтернативного фермента-активатора фактора X представляется весьма перспективным.

Материалы и методы

В исследовании были использованы протеазы с активаторной по отношению к фактору X активностью из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ F- 4104 (получены на кафедре микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова) и препарата из яда гадюки Рассела RVV-X® («Pentapharm», Швейцария), а также лиофилизированная плазма крови человека с различными характеристиками (НПО «Ренам», Россия): плазма с параметрами системы гемостаза в пределах нормы, плазма крови человека с искусственно сниженными параметрами системы гемостаза и плазма крови человека, дефицитная по фактору X.

Получение внеклеточной протеазы продуцента.

Получение протеазы *A. ochraceus* осуществляли в несколько этапов. Сначала проводили осаждение белков из культуральной жидкости сульфатом аммония до 80%-ной степени насыщения на холоду (4°C, 24 ч) с дальнейшим их отделением центрифугированием (15000 g, 4°C, 25 мин) [7]. Затем полученный осадок внеклеточных ферментов перерастворяли в минимальном объеме 0,005М Трис-НСl буфера (рН 8,2) и диализовали против этого же буфера (4°C, 12 ч). Полученный раствор белков центрифугировали при тех же условиях для удаления нерастворимой части осадка. Далее белки супернатанта подвергали изоэлектрофокусированию в колонке объемом 110 мл («ЛКВ», Швеция) в градиенте плотности сахарозы 0–40% по методу Вестерберга (800 В, 4°C, 36 ч), используя амфолины фирмы «ЛКВ» (Швеция) с рН 4–9. Содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1,5 мл с помощью коллектора фракций («ЛКВ», Швеция). Фракции с рI 5,7–6,2, содержащие искомым протеазу, были отобраны для дальнейшей работы [8]. С целью подтверждения гомогенности выделенного белка был проведен денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли. Очистку протеаз от амфолинов и одновременное концентрирование фракции проводили в мембранных концентраторах Microcon Ultracel 30 для эппендорфов («Millipore», США) в соответствии с инструкцией: 500 мкл фракции переносили в мембранные концентраторы и центрифугировали (12400 g, 10 мин). Далее супернатант сливали, а ретентат собирали в новый эппендорф и повторно центрифугировали (1000 g, 1 мин) [6]. В пробе проводили определение белка и активаторной по отношению к фактору X активности.

Определение белка. Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм. Раствор белка, имеющий поглощение при данной длине волны в кювете с длиной пути 1 см, равное 1,00, содержал в 1 мл одну оптическую единицу (о.е., A280) [9].

Определение ферментативной активности.

Активность активатора фактора X определяли, проводя прединкубацию 200 мкл пробы белка *A. ochraceus* или RVV-X® с 50 мкл разведенной в два раза 0,05 М Трис-НСl буфером (рН 8,2) соответствующей плазмы крови в течение 5 мин на термостатической бане BioSan TS-100 (Латвия) при температуре 37±0,1°C. Через 5 мин в смесь вносили 100 мкл хромогенного субстрата Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765) и продолжали инкубацию еще в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Количество высвободившегося *n*-нитроанилина измеряли на спектрофотометре «Hitachi 200-20» (Япония) при длине волны 405 нм [10]. За единицу активности (Е) принимали количество мкмоль отщепившегося за 1 мин *n*-нитроанилина в 1 мл пробы.

Построение калибровочных кривых для определения содержания фактора X в плазме строили в соответствии с протоколом подготовки к работе препарата RVV-X® («Pentapharm», Швейцария).

Эксперименты выполнены в 3 повторностях, полученные результаты приведены как средние величины из трех опытов, для каждой величины даны доверительные интервалы. Статистическую обработку проводили с помощью пакета MS Excel 2013.

Результаты и их обсуждение

Внеклеточная протеаза *A. ochraceus* является потенциальным компонентом диагностикомов для определения концентрации фактора X. Была проведена сравнительная характеристика активаторной по отношению к фактору X активности протеазы, выделенной из культуральной жидкости, лиофилизированного препарата и препарата после изоэлектрофокусирования, которая показана

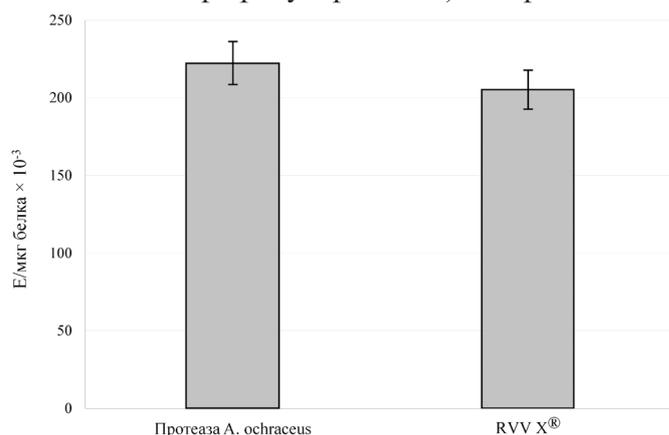


Рис. 1. Удельная активаторная по отношению к фактору X активность протеазы *A. ochraceus* и препарата RVV-X®.

ла (табл. 1), что удельная активаторная активность протеазы после изоэлектрофокусирования в 15,7 раз выше, чем у протеазы, полученной методом лиофилизации, и в 40 раз выше, чем в культуральной жидкости продуцента. Далее производили

сравнение активности выделенного фермента по отношению к фактору X с активностью протеазы из яда змеи, входящей в состав препарата RVV-X® (рис. 1). Видно, что удельная активность протеазы *A. ochraceus* сопоставима с данным показателем

стандартная кривая (А), полученная при использовании в качестве активного компонента диагностического набора препарата RVV-X®, по которой проводят клиническое определение содержания X фактора в плазме крови. График Б на рис. 2 полу-

Таблица 1

Содержание белка и активаторная по отношению к фактору X активность протеазы *Aspergillus ochraceus* в культуральной жидкости, лиофилизированном препарате и фракциях после изоэлектрофокусирования

Параметр	Культуральная жидкость	Лиофилизированный препарат	Активная фракция после изоэлектрофокусирования
Белок, мкг/мл	1,46±0,10	1,08±0,10	0,31±0,10
Активаторная активность по отношению к фактору X, Е ×10 ⁻³	10,7±1,20	20,1±1,20	90,4±1,20
Удельная активаторная активность, (Е/мкг белка) ×10 ⁻³	7,3±1,20	18,6±1,20	291,6±1,20

для змеиногo активатора.

С целью проверки возможности применения протеазы *A. ochraceus* для диагностики фактора X в плазме были построены калибровочные графики с использованием лиофилизированной плазмы крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы в различных разведениях, что предписывается существующими протоколами имеющихся диагностикумов. На рис. 2 показана

график с использованием в качестве активного компонента протеазы *A. ochraceus*. Данный график также линеен, но отличается от калибровочного с использованием RVV-X® по своему уравнению. Показано, что активаторная к фактору X активность протеазы *A. ochraceus* имеет концентрационно-зависимый характер.

Следующий этап исследования заключался в проверке применимости построенных калибровочных графиков для выявления содержания фактора X путем проведения соответствующих реакций с плазмами с искусственно сниженным содержанием этого компонента или дефицитных по нему.

Данные по определению активаторной по отношению к фактору X активности протеазы *A. ochraceus* с плазмами крови с разным содержанием фактора X в сравнении с препаратом RVV-X® представлены в табл. 2. Активаторная активность протеазы *A. ochraceus* сопоставима с активностью к фактору X, определяемой с помощью препарата RVV-X®. Уровень содержания фактора X в использованных плазмах крови (в соответствии с их паспортами) достоверно определяется с помощью как протеазы из яда змеи, так и протеазы *A. ochraceus* (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что протеаза микромицета может быть применима в составе диагностического набора для определения содержания фактора X в плазме крови пациентов.

Таким образом, активность фактора X, определенная в нормальной плазме по стандартной методике с использованием протеазы *A. ochraceus*, сопоставима с этим показателем, оцениваемым с помощью коммерческого аналога – препарата RVV-X®. Протеаза *A. ochraceus* может быть использована для определения X фактора в плаз-

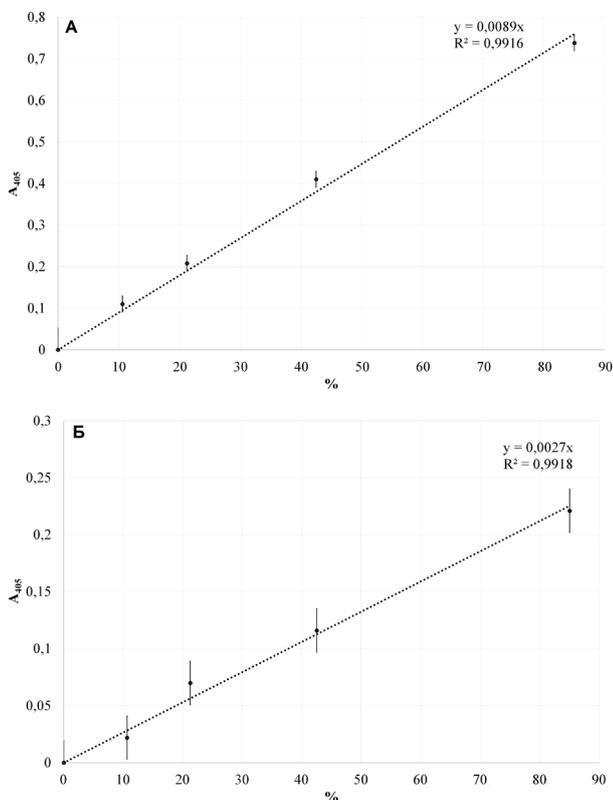


Рис. 2. Калибровочная кривая с лиофилизированной плазмой крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы, полученная с помощью препарата RVV-X® (А) и протеазы *A. ochraceus* (Б).

Таблица 2

Активаторная по отношению к фактору X активность коммерческого диагностикума и протеазы *Aspergillus ochraceus*, определяемая с плазмами со сниженными параметрами системы гемостаза

Тип плазмы	Содержание X фактора, %		
	В соответствии с паспортом	Активатор X фактора (RVV-X®)	Протеаза <i>Aspergillus ochraceus</i>
Нормальная плазма	95 ± 10	95 ± 9	95 ± 12
Плазма патологическая (с искусственно сниженными параметрами системы гемостаза)	38 ± 4	36,6 ± 4	37,4 ± 4
Плазма крови человека, дефицитная по факторам II, VII, X	Менее 1%	Менее 1%	Менее 1%

мах с его пониженным содержанием аналогично препарату RVV-X®. Препарат протеаз *A. ochraceus* может быть рекомендован в качестве нового диагностикума в клинических лабораториях для мониторинга фактора X в плазме крови.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприя-

тий в научно-технической сфере (Соглашение № 9107ГУ/2015).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Girolami A., Molaro G., De Marco L.* Factor X survival and therapeutic factor X levels in the abnormal factor X (factor X Friuli) coagulation disorder // *Acta Haematol.* 1974. Vol. 52. N 4. P. 223–231.
2. *Chatterjee T., Philip J., Nair V., Mallhi R. S., Sharma H., Ganguly P., Biswas A.K.* Inherited factor X (Stuart-Prower factor) deficiency and its management // *Med. J. Armed Forces India.* 2015. Vol. 71. Suppl. 1. P. S184–S186.
3. *Tsevens H., Mandalaki T., Symvoulidis A., Philips H.* Fluctuations and relations of the Quick time and the heparin tolerance test and the X factor during anticoagulant treatment with coumarins // *Arch. Inst. Pasteur Hell.* 1961. Vol. 7. P. 49–58.
4. *Sajevic T., Leonardi A., Križaj I.* Haemostatically active proteins in snake venoms // *Toxicon.* 2011. Vol. 57. N 5. P. 627–645.
5. *Бобровская А. А., Осмоловский А. А., Звонарева Е. С., Крейер В. Г., Кураков А.В.* Протеиназы микромицетов с активностями ферментов системы гемостаза человека // *Усп. мед. микол.* 2015. Т. 14. № 14. С. 414–416.
6. *Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S.* Possibility of application of extracellular proteases of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D for determination of the protein C content in human blood plasma // *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B. Biomed. Chem.* 2018. Vol. 12. N 2. P. 164–166.
7. *Osmolovsky A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S.* Production of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma – by the micromycete *Aspergillus ochraceus* during submerged and solid-state fermentation // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013. Vol. 49. N 6. P. 581–586.
8. *Barranco-Medina S., Murphy M., Pelc L., Chen Z., Di Cera E., Pozzi N.* Rational design of protein C activators // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7: 44596.
9. *Gertler A., Trop M.* The elastase-like enzymes from *Streptomyces griseus* (pronase). Isolation and partial characterization // *Eur. J. Biochem.* 1971. Vol. 19. N 1. P. 90–96.
10. *Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S.* *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. Vol. 48. N 5. P. 488–492.

Поступила в редакцию 11.02.2019 г.
После доработки 07.04.2019 г.
Принята в печать 15.04.2019 г.

SHORT COMMUNICATION

POSSIBILITY OF APPLICATION OF EXTRACELLULAR PROTEASE OF MICROMYCET *ASPERGILLUS OCHRACEUS* FOR DETERMINATION OF FACTOR X CONTENT IN HUMAN BLOOD PLASMA

A.V. Orekhova¹, A.A. Osmolovskiy^{1,*}, V.G. Kreyer¹, N.A. Baranova¹, N.S. Egorov²

¹Biological Faculty and ²International Biotechnology Center, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: aosmol@mail.ru

It has been shown that activity of factor X activity determined in normal plasma using *Aspergillus ochraceus* protease is comparable with the activity of a commercial analogue, a protease from Russell's viper venom (RVV-X[®]). It was revealed that the protease of *A. ochraceus* along with the RVV-X[®] preparation can be used to determine the content of factor X in the plasma with its reduced content. A study of the protease activity of *A. ochraceus*, an activator to factor X, showed that it is slightly higher compared to the snake venom preparation, which can make *A. ochraceus* protease a promising substitute for the snake activator in diagnostics for determining the content of factor X.

Keywords: proteolytic enzymes, activators of factor X, diagnostics of factor X, RVV-X[®], aspergilli protease, pathological plasma

Сведения об авторах

Орехова Анастасия Владимировна – вед. инженер кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: stasya77@list.ru

Осмоловский Александр Андреевич – канд. биол. наук, ст. преп. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru

Крейер Валериана Георгиевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Баранова Нина Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Егоров Николай Сергеевич – докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@mail.ru

Правила для авторов журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология».

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: «введение», «материалы и методы», «результаты», «обсуждение результатов», «выводы», «список литературы». Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но даже в этом случае они должны содержать резюме и ключевые слова. Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, 12 кегль, междустрочный интервал - полуторный), включая список литературы. На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК. В следующих строках приводятся: название работы, инициалы и фамилии авторов, наименование подразделения биологического факультета МГУ, e-mail автора, ответственного за переписку с редакцией. Далее следуют резюме статьи на русском языке (100–250 слов) и ключевые слова (6–10). После текста статьи на отдельной странице печатается резюме на английском языке с заглавием и ключевыми словами (полный перевод русской версии). На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью, научная степень, должность, место работы, телефон (с кодом), e-mail.

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (2–3 таблицы или рисунка с соответствующим уменьшением объема текста). Подписи к рисункам и фотографиям даются на отдельной странице в конце рукописи, они должны содержать расшифровки всех используемых сокращений, а рисунки и таблицы – иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (рис. 1, табл. 2). Графические иллюстрации и фотографии (только черно-белые!) представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов (разрешение должно быть не менее 300 точек на дюйм), не допускается вставка рисунков и фотографий в основной текст. Таблицы печатаются на отдельных страницах в конце рукописи. Каждая графа таблицы должна иметь заголовок.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При ссылке на несколько источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) включает от 10 до 25 ссылок, оформленных следующим образом:

- 1) **Книга:** Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.
- 2) **Статья в сборнике:** Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrillov V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Ed. by J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.
- 3) **Статья в журнале:** Hayflick L. Progress in cytoogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.
- 4) **Тезисы докладов (материалы) конференции:** Бoleева Г.С., Борзых А.А. Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012», секция «Биология» (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.
- 5) **Автореферат диссертации:** Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар, 2012. 23 с.
- 6) **Электронный ресурс:** Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).
- 7) **Электронная публикация:** Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ). Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре

ре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании. При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны курсивом соответствующие латинские названия (род, вид) согласно Международным кодексам номенклатуры.

Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования. Не принимаются к печати работы, которые уже опубликованы или отправлены на печать в другие издания.

Плата с авторов за публикацию не взимается.

Рукописи после рецензирования отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 2 недели, в противном случае статья будет рассматриваться как вновь поступившая.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Тел. 8-495-938-27-01.

С полным текстом правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала – vestnik-bio.msu.elpub.ru.
