

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 79 • № 2 • 2024 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ
ПРИЛОЖЕНИЕ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

**К столетию кафедры физиологии человека и животных биологического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова**

СОДЕРЖАНИЕ

От редакторов

Островский М.А., Абрамочкин Д.В. Достижения современной
физиологии — к столетию кафедры физиологии человека
и животных биологического факультета МГУ 5

Обзоры

Островский М.А. Молекулярный механизм адаптации к световой среде
обитания: к вопросу о спектральной настройке зрительных пигментов
двух популяций креветок *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea) 9

Недоспасов С.А. Цитокины — регуляторы иммунитета. 16

Воронина Я.А., Кархов А.М., Кузьмин В.С. Современные представления
о структурной основе и молекулярных механизмах трансмембранного
транспорта Cl^- в кардиомиоцитах 22

Афанасьева Д.Ю., Балабан П.М. Сложные «простые» нервные системы» 37

Смирнова О.В., Абрамичева П.А., Павлова Н.С. Осморегуляция
и репродукция: эволюционные тренды функций пролактина от рыб
к млекопитающим. 46

Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С., Швецова А.А. Регуляция сокращения
гладкомышечных клеток сосудов в раннем постнатальном онтогенезе 55

Оригинальные исследования

Кузьмина Е.С., Нечаева М.В., Авдонин П.В. Роль NAADP
в поддержании спонтанных сокращений сердца:
сравнительно-физиологические исследования. 65

© Издательство Московского университета,
“Вестник Московского университета”, 2024

Касумян А.О., Левина А.Д. Вкусовая привлекательность органических кислот и их производных для цихлидовых рыб (Cichlidae)	73
Тимошина Ю.А., Терещенко Л.В., Куликова О.И., Федорова Т.Н., Латанов А.В. Моделирование предсимптомной стадии паркинсоноподобного состояния на животных (грызуны и обезьяны).	81
Филатова Т.С., Бородков А.С., Кархов А.М., Джуманиязова И.Х., Пустовит О.Б., Абрамочкин Д.В. Механизмы воздействия полиароматических углеводородов нефти на электрическую активность сердца северной наваги (<i>Eleginus nawaga</i>)	89
Богачева П.О., Чернышев К.А., Тарасова Е.О., Потапова Д.А., Балезина О.П. Регуляция активности регенерирующих моторных синапсов с участием эндоканнабиноидов	98
Яковлев Л.В., Сыров Н.В., Мирошников А.А., Морозова М.В., Беркмуш-Антипова А.М., Петрова Д.А., Каплан А.Я. Локализация источников десинхронизации мю-ритма ЭЭГ при тактильном воображении.	105

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 79 • No. 2 • 2024 • APRIL — JUNE
SUPPLEMENT

Quarterly

Moscow University Press

**In commemoration of centennial anniversary
of the Department of Human and Animal Physiology of Moscow State University**

CONTENTS

Editorial

- Ostrovsky M.A., Abramochkin D.V. Current advances in physiological science.
In commemoration of centennial anniversary of the Department of Human
and Animal Physiology of Moscow State University 5

Reviews

- Ostrovsky M.A. Molecular mechanism of adaptation to a light environment:
on the issue of visual pigments spectral tuning of two populations of shrimp
Mysis relicta (Crustacea: Mysidacea) 9
- Nedospasov S.A. Cytokines – regulators of immunity 15
- Voronina Y.A., Karhov A.M., Kuzmin V.S. Structural basis and molecular
mechanisms of Cl⁻ transmembrane transport in cardiomyocytes 22
- Afanasyeva D.Yu., Balaban P.M. Complex “simple nervous systems”. 37
- Smirnova O.V., Abramicheva P.A., Pavlova N.S. Osmoregulation
and reproduction: evolutionary trends in prolactin functions
from fish to mammals. 46
- Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Shvetsova A.A. Regulation of vascular
smooth muscle contraction during early postnatal ontogenesis 55

Research articles

- Kuzmina E.S., Nechaeva M.V., Avdonin P.V. The role of NAADP
in maintaining spontaneous heart contractions:
comparative physiological studies 65

Kasumyan A.O., Levina A.D. Palatability of organic acids and their derivatives for cichlid fishes (Cichlidae)	73
Timoshina Yu.A., Tereshchenko L.V., Kulikova O.I., Fedorova T.N., Latanov A.V. Modeling the pre-symptomatic stage of hemi-parkinsonian state in animals (rodents and monkeys)	81
Filatova T.S., Borodkov A.S., Karkhov A.M., Dzhumaniiazova I.H., Pustovit O.B., Abramochkin D.V. The mechanisms of effects of oil-derived polyaromatic hydrocarbons on cardiac electrical activity in navaga cod (<i>Eleginus nawaga</i>)	89
Bogacheva P.O., Chernyshev K.A., Tarasova E.A., Potapova D.A., Balezina O.P. Regulation of neurotransmission in regenerating neuromuscular junctions involving endocannabinoids.	98
Yakovlev L.V., Syrov N.V., Miroshnikov A.A., Morozova M.V., Berkmush-Antipova A.M., Petrova D.A., Kaplan A.Y. Source localization of mu-rhythm event related desynchronization in EEG during tactile imagery. . . .	105

ОТ РЕДАКТОРОВ



Достижения современной физиологии — к столетию кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ

М.А. Островский^{1,2}, Д.В. Абрамочкин³, * 

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

²Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4;

³Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: abram340@mail.ru

В статье представлен краткий обзор публикаций, размещенных в специальном выпуске журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология», посвященном столетию со дня основания кафедры физиологии человека и животных МГУ имени М.В. Ломоносова выдающимся русским физиологом А.Ф. Самойловым. Вкратце рассмотрены основные вехи истории кафедры физиологии человека и животных. В контексте задач, стоящих перед современной физиологической наукой, обсуждаются работы, представленные ведущими исследователями нашей страны, в том числе научными коллективами кафедры физиологии человека и животных.

Ключевые слова: кафедра физиологии человека и животных, юбилей кафедры, Московский университет, сравнительная физиология, экспериментальные модели, онтогенез

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-1

3 октября 2024 г. исполняется 100 лет со дня основания выдающимся русским физиологом Александром Филипповичем Самойловым кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Разумеется, история преподавания физиологии в Московском университете насчитывает много больше столетия. Она началась в конце 70-х гг. XVIII в., когда на медицинском факультете университета профессор С.Г. Забелин прочитал первые лекции по физиологии человека. Официально датой рождения кафедры физиологии в МГУ считается 1776 г., когда начались регулярные чтения лекций по физиологии человека на медицинском факультете. В начале XIX в. (с 1813 по 1835 гг.) кафедру возглавлял выдающийся ученый, профессор Е.О. Мухин, преемником которого стал профессор А.М. Филомафитский. Он первый ввел в преподавание физиологии демонстрацию опытов на животных. Благодаря деятельности А.М. Филомафитского Московский университет может считаться родоначальником экспериментальной физиологии в России. С 1889 по 1901 гг. кафедрой руководил великий русский физиолог И.М. Сеченов. При Сеченове в Москве, на Моховой улице было открыто новое здание, получившее название «Физиологический институт императорского

Университета». Любимым учеником Сеченова в московский период его работы был молодой физиолог А.Ф. Самойлов. После выделения из состава Московского университета медицинского факультета, в том числе кафедры физиологии, было принято решение о создании на Естественном отделении Физико-математического факультета Московского Университета новой кафедры — кафедры физиологии животных. В качестве заведующего был приглашен А.Ф. Самойлов — к тому времени физиолог с мировым именем. 3 октября 1924 г. по приказу СОВНАРКОМА РСФСР в рамках Естественного отделения физико-математического факультета в МГУ и была организована новая кафедра — кафедра физиологии животных, во главе с заведующим — профессором А.Ф. Самойловым, который руководил кафедрой до своей кончины в 1930 г.

Преемником А.Ф. Самойлова стал воспитанник Московского университета профессор И.Л. Кан. А в 1943 г. кафедру возглавил и руководил ею до 1961 г. член-корреспондент АН СССР Х.С. Коштоянц. При нем кафедра достигла наибольшего расцвета, признания и, можно сказать, всемирной известности. Основными направлениями исследований на кафедре в то время были сравнительная и эволюционная физиология.

В настоящее время сравнительно-физиологический подход к решению вопросов фундаментальной физиологии является визитной карточкой многих проводимых на кафедре физиологии человека и животных исследований. Этим университетская кафедра физиологии биологического факультета МГУ принципиально отличается от физиологических кафедр медицинских ВУЗов. После внезапной кончины Х.С. Коштоянца кафедрой недолгое время руководил академик АМН СССР А.В. Лебединский — крупнейший физиолог, ближайший ученик академика Л.А. Орбели. С 1964 г. по 1985 г. кафедрой заведовал профессор Б.А. Кудряшов — автор ряда основополагающих работ по механизмам свертывания крови. Его сменил генерал-майор медицинской службы, академик РАМН И.П. Ашмарин, заведовавший кафедрой с 1986 по 2006 гг. При нем на кафедре были широко развернуты исследования нейропептидов. С 2007 по 2023 гг. кафедрой руководил ученик И.П. Ашмарина, профессор А.А. Каменский, продолживший направление исследований своего учителя.

За сто лет после создания кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ физиологическая наука радикально преобразилась. Практически полностью изменился методический арсенал исследователей-физиологов. Фокус внимания исследователей сместился на клеточный и молекулярный уровень. Современная физиология стала в полном смысле слова междисциплинарной наукой — стираются границы между физиологией, биохимией, биофизикой, молекулярной биологией. Одно остается неизменным — стремление физиологов подняться от описания структур и функций организма к выяснению механизмов, в том числе сложнейших молекулярных механизмов реализации физиологических функций и их регуляции.

Эта тенденция прослеживается и в работах, представленных в настоящем специальном выпуске журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология». Работы представлены ведущими исследователями нашей страны, в том числе сотрудниками кафедры физиологии человека и животных. Все они посвящены раскрытию тонких механизмов реализации физиологических функций у организмов различных систематических групп, находящихся на разных стадиях онтогенеза, в разных условиях среды.

Обзор М.А. Островского посвящен молекулярным механизмам адаптации к световой среде обитания, к раскрытию которых удалось приблизиться благодаря сравнительному исследованию зрительных и экранирующих пигментов у двух популяций одного вида креветок (*Mysis relicta*): морской, обитающей в условиях хорошей освещенности, и озерной, обитающей на большой глубине, куда доходит ничтожное количество света [1].

Обзор С.А. Недоспасова, одного из признанных лидеров иммунологии мирового уровня, посвящен актуальному разделу современной физиологии иммунной системы, а именно цитокинам — ключевым медиаторам многих физиологических процессов, в первую очередь, иммунологических [2]. Они играют центральную роль в построении иммунной системы растущего организма. Исключительно интересен в обзоре раздел «Медицинские применения науки о цитокинах», поскольку цитокины играют важную роль в патогенезе многих заболеваний, а рецепторы для цитокинов могут стать терапевтическими мишенями новых лекарственных средств.

Молекулярным механизмам трансмембранного транспорта Cl^- в кардиомиоцитах посвящен обзор коллектива под руководством В.С. Кузьмина [3]. Долгое время внимание электрофизиологов было приковано в основном к ионным каналам и транспортерам катионов. Однако в последние годы было выявлено несколько типов хлорных каналов, которые вместе с хлорными котранспортерами и хлор-бикарбонатными обменниками регулируют гомеостаз Cl^- и вносят важный вклад в формирование электрической активности сердца. Эти белки, в первую очередь хлорные каналы, могут выступить в будущем в качестве нового типа мишеней для антиаритмических препаратов.

В обзоре Д.Ю. Афанасьевой и П.М. Балабана рассматриваются механизмы обучения и памяти, пищевого, полового, оборонительного и исследовательского поведения у наземных улиток рода *Helix* [4]. Приблизиться к пониманию организации механизмов сложных форм поведения на уровне отдельных нейронов с определенными функциями и нейронных кластеров стало возможным именно благодаря использованию данного уникального объекта исследования, то есть применив принцип основателя сравнительной физиологии А. Крога — «для каждой задачи можно найти животное, лучше всего подходящее для ее решения». Тот же принцип был использован и в экспериментальной работе коллектива под руководством П.В. Авдониной, проведенной на изолированном сердце виноградной улитки и сердце куриного зародыша на ранней стадии развития, еще не имеющем иннервации [5]. Благодаря использованию данных объектов коллективу удалось продемонстрировать новый механизм регуляции спонтанных сердечных сокращений, основанный на действии нового вторичного мессенджера, адениндинуклеотидфосфата никотиновой кислоты. А вот для изучения механизмов хеморецепции у позвоночных, пожалуй, лучшими объектами являются рыбы. Вкусовая чувствительность, изучению которой посвящена работа А.О. Касумяна и А.Д. Левиной, у рыб на несколько порядков выше, чем у амфибий, рептилий и млекопитающих [6].

Коллектив авторов под руководством А.В. Латанова попытался в своем сравнительном исследовании выяснить, какие животные лучше подходят для моделирования болезни Паркинсона — грызуны или приматы. Как оказалось, обе модели имеют определенные достоинства и недостатки, каждая из них лучше подходит для изучения разных конкретных аспектов такой сложной патологии как паркинсонизм [7].

В ходе филогенеза в группе позвоночных животных зачастую одна и та же задача оказывалась решенной несколько различными способами у животных разных систематических групп. С другой стороны, один и тот же инструмент оказывался приспособлен к выполнению принципиально разных функций. Иллюстрация первого явления представлена в работе группы Д.В. Абрамочкина, посвященной электрической активности северной наваги. Несмотря на то, что потенциал действия в сердце рыбы очень похож на таковой в сердце человека, он обеспечивается иным набором ионных токов. Побочным следствием таких различий является высокая чувствительность электрической активности сердца рыб к загрязнителям — полиароматическим углеводородам [8], значительно меньше выраженная у млекопитающих. Иллюстрация второго явления представлена в обзоре группы О.В. Смирновой, посвященном осморегуляторной функции пролактина у рыб. В ходе эволюции позвоночных, функции, выполняемые этим гормоном, сменились: у млекопитающих он работает как половой гормон, но у рыб главным образом выражена его эволюционно древняя функция — регуляция водно-солевого обмена, исполнение которой, как демонстрируют авторы, зависит от пола животного [9].

Механизмы осуществления физиологических функций изменяются не только в ходе филогенеза, но и в процессе онтогенеза и развития отдельных органов. Группа О.С. Тарасовой уже много лет занимается изучением особенностей регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном онтогенезе. В обзоре, представленном в данном

спецвыпуске, рассмотрены различия механизмов регуляции сокращения гладкомышечных клеток сосудов в раннем постнатальном онтогенезе и у взрослых животных, в частности, возрастные изменения функционирования ионных каналов, определяющих уровень мембранного потенциала и внутриклеточную концентрацию ионов кальция, а также изменения кальциевой чувствительности сократительного аппарата [10]. Экспериментальная работа группы О.П. Балезиной посвящена регуляции функциональной активности незрелых, регенерирующих моторных синапсов млекопитающих. Авторы показали, что несмотря на ослабленное функциональное состояние, незрелые синапсы обладают высокой реактивностью к эндогенным каннабиноидам — анандамиду, тормозящему синаптическую передачу, и 2-арахидоноилглицерину, напротив, оказывающему потенцирующее действие [11].

Завершает спецвыпуск экспериментальная работа группы А.Я. Каплана, специализирующаяся в области нейроинтерфейсных технологий. Интерфейсы мозг-компьютер позволяют функционально дополнять организм человека, что особенно актуально для людей, потерявших часть моторных функций в результате нейротравм или инсультов. Представленная работа посвящена определению характерных изменений в ЭЭГ человека при тактильном воображении и тактильной стимуляции и определению участия прецентральной и постцентральной области коры в процессе десинхронизации мю-ритма ЭЭГ. Авторы делают вывод о возможности использования тактильного воображения для создания новых реабилитационных методик и поиска новых контуров нейрокомпьютерного взаимодействия [12].

Кураторы настоящего специального выпуска журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» надеются, что представленные статьи вызовут интерес у читателей и, хотя бы в малой степени отразят состояние современной физиологической науки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островский М.А. Молекулярный механизм адаптации к световой среде обитания: к вопросу о спектральной настройке зрительных пигментов двух популяций креветок *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea). *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):9–15.
2. Недоспасов С.А. Цитокины — регуляторы иммунитета. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):16–21.
3. Воронина Я.А., Кархов А.М., Кузьмин В.С. Современные представления о структурной основе и молекулярных механизмах трансмембранного транспорта Ca^{2+} в кардиомиоцитах. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):22–36.

4. Афанасьева Д.Ю., Балабан П.М. Сложные «простые» нервные системы». *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):37–45.
5. Кузьмина Е.С., Нечаева М.В., Авдонин П.В. Роль NAADP в поддержании спонтанных сокращений сердца: сравнительно-физиологические исследования. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):65–72.
6. Касумян А.О., Левина А.Д. Вкусная привлекательность органических кислот и их производных для цихлидовых рыб (Cichlidae). *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):73–80.
7. Тимошина Ю.А., Терещенко Л.В., Куликова О.И., Федорова Т.Н., Латанов А.В. Моделирование

предсимптомной стадии паркинсоноподобного состояния на животных (грызуны и обезьяны). *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):81–88.

8. Филатова Т.С., Бородков А.С., Кархов А.М., Джуманиязова И.Х., Пустовит О.Б., Абрамочкин Д.В. Механизмы воздействия полиароматических углеводородов нефти на электрическую активность сердца северной наваги (*Eleginus nawaga*). *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):89–97.

9. Смирнова О.В., Абрамичева П.А., Павлова Н.С. Осморегуляция и репродукция: эволюционные тренды функций пролактина от рыб к млекопитающим. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):46–54.

10. Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С., Швецова А.А. Регуляция сокращения гладкомышечных клеток сосу-

дов в раннем постнатальном онтогенезе. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):55–64.

11. Богачева П.О., Чернышев К.А., Тарасова Е.О., Потапова Д.А., Балежина О.П. Регуляция активности регенерирующих моторных синапсов с участием эндоканнабиноидов. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):98–104.

12. Яковлев Л.В., Сыров Н.В., Мирошников А.А., Морозова М.В., Беркмуш-Антипова А.М., Петрова Д.А., Каплан А.Я. Локализация источников десинхронизации мю-ритма ЭЭГ при тактильном воображении. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2024;79(2S):105–112.

Поступила в редакцию 15.07.2024

Принята в печать 26.07.2024

EDITORIAL

Current advances in physiological science. In commemoration of centennial anniversary of the Department of Human and Animal Physiology of Moscow State University

M.A. Ostrovsky^{1,2}, D.V. Abramochkin³, * 

¹Department of Molecular Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina st., 4, Moscow, 119334, Russia;

³Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: abram340@mail.ru

Hereby we briefly review the articles that comprise the special issue of “Lomonosov Biology Journal” (“Vestnik Moskovskogo universiteta. Seria 16. Biologia”), which commemorates the centennial anniversary of the Department of Human and Animal Physiology of Lomonosov Moscow State University, founded by prominent Russian physiologist Alexander F. Samoilov. The main stages of the Department’s history are briefly described. The published studies of the leading Russian researchers, including the scientific research group from Department of Human and Animal Physiology, are discussed within the scope of main current challenges of physiological science.

Keywords: Department of Human and Animal Physiology, anniversary of the Department, Moscow University, comparative physiology, experimental models, ontogenesis

Сведения об авторах

Островский Михаил Аркадьевич — докт. биол. наук, проф., академик РАН, зав. кафедрой молекулярной физиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: ostrovsky3535@mail.ru

Абрамочкин Денис Валерьевич — докт. биол. наук, зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: abram340@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5751-8853>

ОБЗОР

УДК 577.354



Памяти Хачатура Сергеевича Коштоянца

Молекулярный механизм адаптации к световой среде обитания: к вопросу о спектральной настройке зрительных пигментов двух популяций креветок *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea)

М.А. Островский^{1,2}¹Кафедра молекулярной физиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
e-mail: ostrovsky3535@mail.ru

В статье рассматриваются световая среда обитания двух популяций креветок вида *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea) и молекулярный механизм спектральной настройки их зрительных пигментов. Представлены данные, согласно которым спектральная настройка основана на экспрессии генов разных опсинов, а не на замене хромофорных групп: ретиналь-1 (A1) ↔ ретиналь-2 (A2).

Ключевые слова: зрение, родопсин, спектральная настройка, ракообразные, сравнительная физиология

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-2

Введение

Два тесно переплетавшихся направления — сравнительная и эволюционная физиология и «энзимохимия нервного возбуждения» составляли суть школы Х.С. Коштоянца. Школа эта оказала сильнейшее влияние на ее воспитанников, в том числе и на меня. Моя первая научная публикация касалась сравнительной физиологии беспозвоночных, а именно двигательной активности актиний *Actinia equina* приливно-отливной зоны Баренцева моря [1]. Работу эту я выполнял, будучи второкурсником, на Биологической станции Академии наук СССР в Дальних Зеленцах. Еще до публикации самой статьи Х.С. Коштоянц включил мой результат с оригинальной записью двигательной активности актинии во второй том своего фундаментального труда — «Основы сравнительной физиологии. Сравнительная физиология нервной системы» 1957 года (стр. 210–211) (рис. 1) [2]. Много лет спустя я вернулся к сравнительной физиологии. Это была сравнительная физиология зрения ракообразных. Сначала на биостанции Академии наук СССР «Витязь» на Дальнем Востоке мы исследовали спектральную чувствительность и зрительные пигменты прибрежного краба *Hemigrapsus sanguineus* [3].

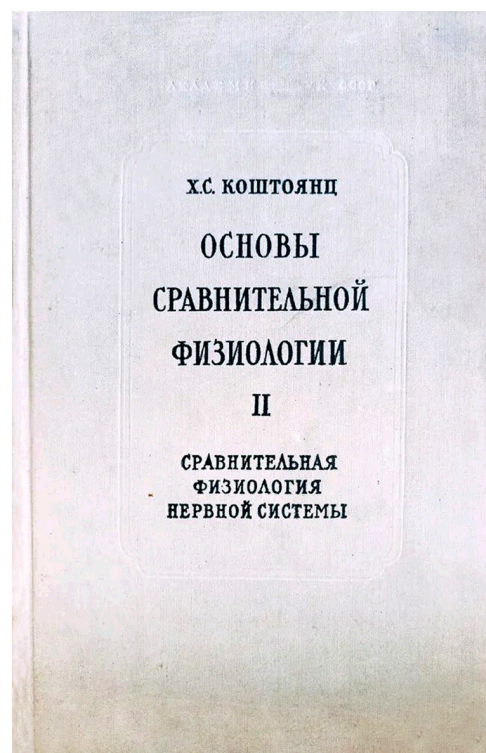


Рис. 1. Титульный лист II тома фундаментального труда Х.С. Коштоянца «Основы сравнительной физиологии. Сравнительная физиология нервной системы».

А затем, в самом конце 80-х—начале 90-х гг. началось наше более чем тридцатилетнее сотрудничество с группой физиологов Хельсинского университета, возглавлявшейся сначала профессором Кай-Отто Доннером, в то время Президентом Академии наук Финляндии, а после его кончины сыном, профессором Кристианом Доннером. Целью было исследование механизмов адаптации зрения беспозвоночных к меняющимся условиям световой среды обитания. Объектом исследования были две популяции креветок *Mysis relicta* (Crustacea, Mysidae) — озерной и морской; их зрительные и экранирующие пигменты. Эта предложенная Кай-Отто Доннером экспериментальная модель — две популяции креветок одного и того же вида — оказалась для нас чрезвычайно удачной. Основные результаты этого сотрудничества опубликованы в цикле работ [4–11].

В настоящей статье обсуждается один из вопросов этого многолетнего исследования. Речь идет о молекулярном механизме спектральной настройки зрительных пигментов родопсинов у озерной и морской популяций креветок *Mysis relicta*. Полученные в этом отношении в самое последнее время данные меняют наши первоначальные представления о механизме такой настройки.

Креветки *M. relicta* как объект для исследования механизмов адаптации к световой среде обитания

Эволюционная и сравнительная физиология зрительных пигментов — увлекательная и непреходяще актуальная область биологии [12–16]. Механизмы адаптации к световой среде обитания — одна из ее проблем. Род ракообразных *Mysis* можно рассматривать как исключительно удобную модель для исследования «быстрого» адапционного ответа на изменение как условий освещенности среды обитания, так и других экологических факторов, например, солености. Мизиды неоднократно меняли среду обитания как на межвидовом, так и внутривидовом уровнях. Причем меняли за разные периоды времени — от миллионов лет до всего нескольких тысячелетий. Адаптацию к смене среды обитания в течение нескольких тысячелетий следует рассматривать как «быструю» адаптацию.

Морская и озерная популяции вида *M. relicta* разделились сравнительно недавно — в конце ледникового периода, всего около 10 тыс. лет назад. В пресных и малопрозрачных водах, содержащих различного рода взвеси, уже на сравнительно небольшой глубине света доходит мало, при этом в силу спектральной фильтрации свет смещен в длинноволновую область спектра. На рис. 2 представлено нормированное спектральное распределение света в море (Роё, залив Балтийского моря) и в глубоководном озере Рääjärvi Финляндии, откуда мы добывали креветок для наших экспериментов. В морском заливе креветки обитают

на сравнительно небольшой глубине, в озере — на достаточно большой глубине, куда света доходит, можно сказать, ничтожное количество. Как видно, различие в спектральном составе света весьма впечатляющее. Поэтому, если говорить об адаптации к световой среде обитания, то спектры поглощения зрительных пигментов должны быть разнесены: у озерных креветок максимум спектра должен быть смещен в длинноволновую область, а у морских — в коротковолновую.

Следует отметить при этом, что у озерных креветок экранирующие пигменты не должны мешать доступу света к родопсину в их омматидиях. Как выяснилось, так оно и есть: концентрация экранирующих пигментов оммохромов в глазах креветок озерной популяции почти вдвое ниже, чем в глазах морской [4]. Однако значительная потеря экранирующих пигментов в глазах креветок озерной популяции становится одной из причин их исключительной чувствительности к световому повреждению, поскольку оммохромы, как мы показали, обладают выраженными антиоксидантными свойствами [17, 18]. Действительно, даже умеренное вечернее освещение на поверхности воды приводит у этой популяции креветок к полной потере зрения [19]. Вместе с тем, падение в концентрации экранирующих пигментов в ходе адаптации глаза к глубоководному образу жизни можно также рассматривать как один из эффективных механизмов приспособления к световой среде обитания, способствующий максимальному «улавливанию» квантов света в условиях чрезвычайно низкой освещенности. Достаточно же высокая концентрация оммохромов в глазах морской популяции, обитающей на небольшой глубине в условиях хорошей освещенности, — важный адаптационный фактор, ответственный за их устойчивость к свету.

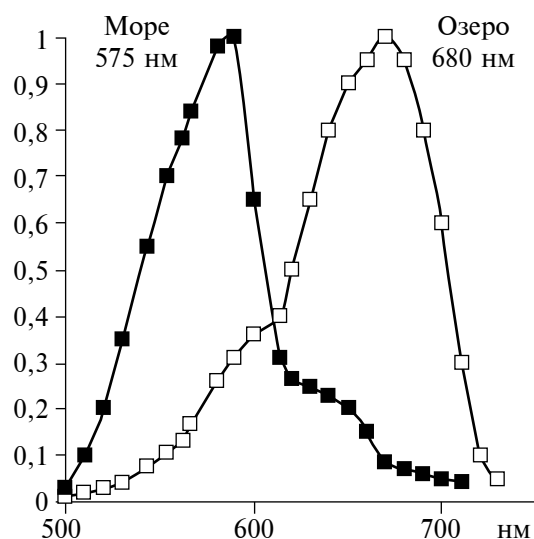


Рис. 2. Спектральное распределение света в заливе Роё Балтийского моря и в глубоком озере Рääjärvi в Финляндии.

Зрительную адаптацию к различному спектральному составу света в море и в глубоководных озерах в значительной мере обеспечивает длинноволновый спектральный сдвиг. Он отчетливо проявляется у озерных популяций северных видов мизид, претерпевших более чем двухмиллионный период эволюции и дивергенцию опсинового гена. Действительно, у всех изученных озерных родственных мизид финно-скандинавских видов — *M. relicta*, *M. salemaai* и *M. segerstralei* — спектр поглощения доминирующего зрительного пигмента сдвинут примерно на 20–30 нм в длинноволновую (красную) область по сравнению с креветками морских популяций этих же видов [20].

При этом следует подчеркнуть, что по сравнению со спектрами поглощения зрительных пигментов в рабдомимах, спектральная чувствительность глаза мизид еще дальше сдвинута в красную область спектра. Сдвинута она благодаря экранирующим пигментам, значительно ослабляющим свет в синей области спектра. По нашим данным, длинноволновый сдвиг спектральной чувствительности глаза обеспечивается вкладом желтых экранирующих пигментов: одним из оммохромов — ксантоматином и каротиноидами, поглощающими свет в синей области спектра [7]. При этом, несмотря на фильтрацию, разница в спектральной чувствительности озерных и морских популяций креветок, соответственно в длинно- и коротковолновой областях спектра, сохраняется. Иными словами, по сравнению с морской, спектральная чувствительность глаза озерной популяции смещена примерно на 30 нм в красную область спектра.

Механизм спектральной настройки зрительного пигмента у морской и озерной популяций креветок *M. relicta*

В принципе, спектральная настройка зрительных пигментов возможна в двух временных шкалах: длительной эволюционной и сравнительно краткосрочной, адаптационной — физиологической. Первая связана с аминокислотными заменами в хромофорном центре белковой части молекулы — опсине, вторая — в основном с хромофорной группой, ретиналем. Что касается аминокислотных замен, то, например, сдвиг спектра поглощения «ультрафиолетового» пигмента в фиолетово-синюю область требует в хромофорном центре опсина всего одной аминокислотной замены [21]. Механизмы «быстрой» адаптационной настройки весьма разнообразны. Основной и самый «быстрый» внутримолекулярный механизм спектральной настройки — это замена хромофора: ретиналя-1 (хромофора A1) на ретиналь-2 (хромофор A2) в том же самом опсине (рис. 3). Замена ретиналя-1 на ретиналь-2, имеющий добавочную двойную связь в бета-иононовом кольце молекулы, приводит к длинноволновому смещению максимума спектра поглощения примерно на 30 нм [22]

и является одним из основных внутримолекулярных механизмов «быстрой» спектральной настройки. Именно переходы A1 ↔ A2 (родопсин ↔ порфиросин) обеспечивают «быструю» адаптацию к световой среде обитания — сезонную настройку спектральной чувствительности глаза у рыб и амфибий [23, 24]. Такой же переход A1 ↔ A2 известен, по крайней мере, у одного вида ракообразных — у пресноводных крабов, у которых баланс между двумя формами хромофоров зависит от факторов окружающей среды, в первую очередь света и температуры [25].

Внутримолекулярный механизм спектральной настройки обеспечивается взаимодействием ретиналя в хромофорном центре опсина с близлежащими аминокислотными остатками в ближайшем белковом окружении. Ковалентная, протонированная, положительно заряженная связь альдегидной группы ретиналя с лизиновым остатком опсина позволяет осуществлять смещение максимума спектра поглощения молекулы зрительного пигмента во всем видимом и частично ближнем ультрафиолетовом диапазоне ($\lambda_{\max} \approx 380\text{--}700$ нм). При наличии такой ковалентной связи спектральная настройка происходит благодаря электростатическому взаимодействию ретиналя с конкретными аминокислотными остатками в хромофорном центре опсина (для обзора см. [26]). Это ярко иллюстрирует сайт-направленный мутагенез, когда разные мутанты одной и той же молекулы с аминокислотными заменами имеют разные спектры поглощения [27].

Таким образом, возвращаясь к двум популяциям одного и того же вида креветок *M. relicta*, очевидно, что если спектры поглощения родопсина у них различаются, то это может зависеть или от природы хромофора — замены ретиналя-1 (A1) на ретиналь-2 (A2), или от отличающихся опсинов. Естественно было предположить, что если речь идет о «быстрой» адаптационной настройке (всего 10 тысяч лет!), то можно ожидать замены ретиналя-1 у морской популяции на ретиналь-2 у озерной.

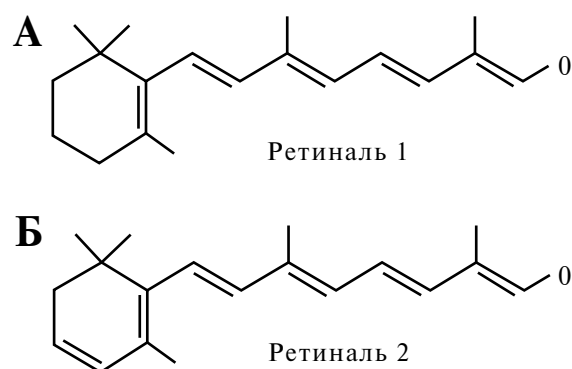


Рис. 3. Структурные формулы: (А) ретиналя-1 и (Б) ретиналя-2, имеющего добавочную двойную связь в бета-иононовом кольце.

Используя технику микроспектрофотометрии отдельных рабдомов глаза морской и озерной популяций *M. relicta*, в сериях экспериментов, выполненных нами в течение нескольких сезонов, было показано, что спектры поглощения родопсина популяций отличаются (рис. 4). Максимум спектра поглощения родопсина морских креветок находится в области 530 нм, а у обитающей на достаточно большой глубине озерных — в области 560 нм [5, 7]. В работе [5] нами было сделано предположение, что разница в положении спектров поглощения связана с разными хромофорами —

ретиаль-1 (A1) у морских и ретиаль-2 (A2) у озерных.

Следующим шагом была проверка этого предположения. Используя метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, нами было четко показано, что различия в спектрах поглощения родопсинов в глазах озерной и морской популяций *M. relicta* не связаны с использованием различных форм хромофоров — и у тех, и у других хромофором оказался 11-цис изомер ретиналя-1 (A1); хромофор ретиаль-2 (A2) у них отсутствовал (рис. 5) [9]. Это был довольно

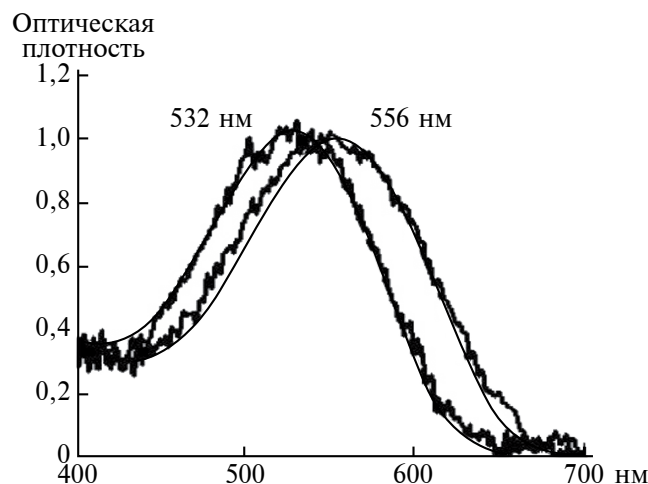


Рис. 4. Микроспектрофотометрическая регистрация спектров поглощения одиночных рабдомов глаза *Mysis relicta*. Слева — спектр поглощения рабдома морской популяции из залива Рого Балтийского моря. Справа — спектр поглощения рабдома озерной популяции из озера Раяярви в Финляндии. Рисунок адаптирован из работы [7].

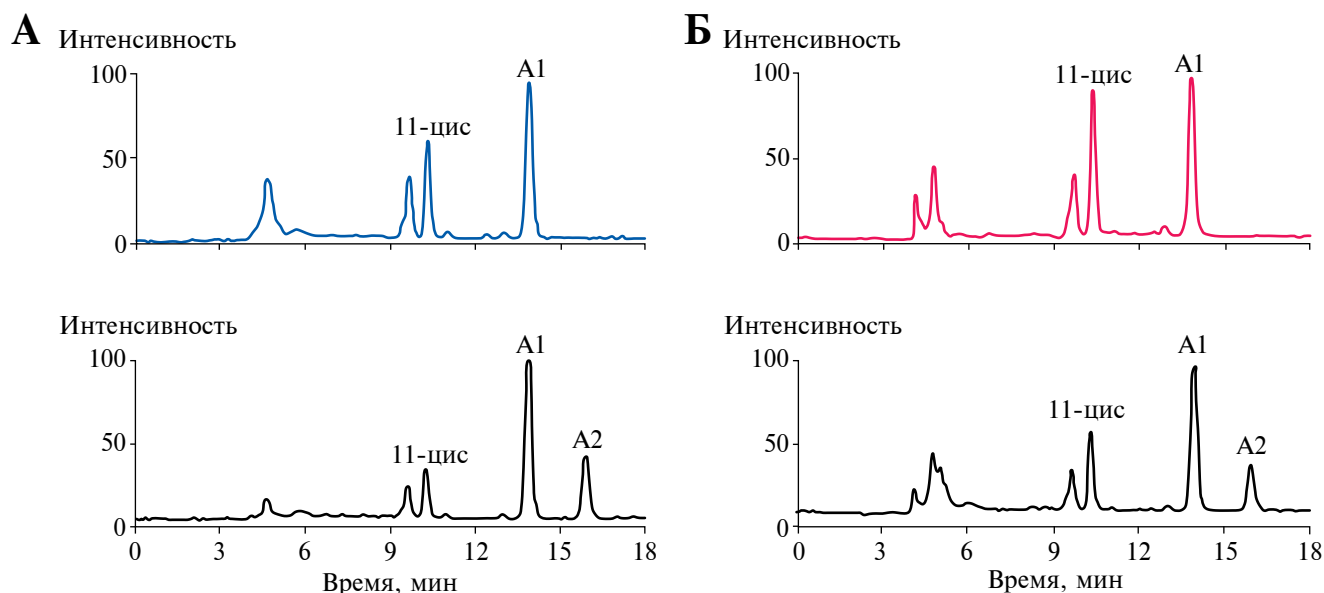


Рис. 5. Сравнительный хроматографический (высокоэффективная жидкостная хроматография) анализ экстрактов ретиналя из глаз морской и озерной популяций *Mysis relicta*. Рисунок адаптирован из работы [9].

(А) Морская популяция. Верхняя хроматограмма: экстракт ретиналя из глаз креветок морской популяции. Нижняя хроматограмма: смесь экстракта ретиналя из глаз и стандартов — синтетических ретиналя-1 (A1) и ретиналя-2 (A2). Видно, что в экстракте (верхняя хроматограмма) ретиаль-1 (A1) присутствует, а ретиаль-2 (A2) отсутствует.

(Б) Озерная популяция. Верхняя хроматограмма: экстракт ретиналя из глаз креветок озерной популяции. Нижняя хроматограмма — смесь экстракта ретиналя из глаз и стандартов — синтетических ретиналя-1 (A1) и ретиналя-2 (A2). Видно, что в экстракте (верхняя хроматограмма) ретиаль-1 (A1) присутствует, а ретиаль-2 (A2) также отсутствует.

неожиданный результат. Объяснение, которое мы ему дали (и оно остается справедливым), состоит в том, что мизиды — это исходно морские ракообразные, а не пресноводные. А для морских ракообразных характерен именно ретиналь-1 (A1) в качестве хромофора. Это подтверждали и наши собственные данные, полученные на морском дальневосточном прибрежном крабе *Hemigrapsus sanguineus* [3]. И хотя мизиды меняли, притом неоднократно, среду обитания с морской на пресноводную и обратно, биохимическая система обмена $A1 \leftrightarrow A2$ у них так и не появилась. Иными словами, будучи исходно морскими ракообразными, мизиды, приспосабливаясь к световой среде обитания, не использовали обмен $A1 \leftrightarrow A2$ для изменения спектральной чувствительности глаза.

Поскольку у озерной и морской популяций *M. relicta* хромофором зрительного пигмента оказался 11-цис изомер ретиналя-1 (A1), то, следовательно, у них должны отличаться опсины. Однако попытки найти у них различия между опсинами не увенчались успехом. Конкретно, в работе [20], не было найдено разницы в гене опсина, кодирующего аминокислотную последовательность родопсина в рабдомах озерной и морской популяций *M. relicta*. В то же время, при сравнении трех различных видов мизид — *M. relicta*, *M. salemaai* и *M. segerstralei* — различия генов опсина между видами в этой же работе [20] найдены были. Таким образом, вопрос о природе различия спектров поглощения родопсинов в двух популяциях одного и того же вида *M. relicta*, что называется, «повисал в воздухе». И только совсем недавно, в докладе Кристиана Доннера и сотрудников, сделанном на симпозиуме «VISIONARIUM XXI, 2023», впервые были представлены результаты, свидетельствующее о том, что у озерной и морской популяций *M. relicta* экспрессируется не один, а как минимум два гена опсинов [28]. Интересно при этом, что тот единственный ген опсина *M. relicta*, который был описан в работе [20], Доннером и сотрудниками вообще не был найден, но были экспрессированы другие, потенциальные гены опсинов. Как пишут сами авторы: «Дифференциальная экспрессия двух или более генов опсина может объяснить спектральную адаптацию в физиологическом масштабе времени у *M. relicta*, хотя контролирующий фактор среды остается неизвестным».

Итак, обнаруженное нами различие в положении максимумов спектра поглощения зрительных пигментов морских и озерных креветок *M. relicta* объясняется не различием хромофоров — у обеих популяций обнаруживался один и тот же хромофор — ретиналь-1 (A1), а различием опсинов. Вопрос о том, какой фактор среды вовлечен в «бы-

струю» зрительную адаптацию разделившихся всего 10 тыс. лет назад, в постледниковый период, двух популяций одного и того же вида креветок *M. relicta*, остается открытым. Крайне интересен и требует дальнейших исследований механизм, обеспечивающий преимущественную экспрессию гена того или иного опсина у озерной и морской популяций.

В свете новых данных об экспрессии двух или более генов опсина разумное объяснение получают результаты, полученные нами в свое время в микроспектрофотометрических и электрофизиологических экспериментах [8]. Суть результатов этих взаимодополняющих экспериментов состояла в том, что в рабдомах глаза каждой из популяций *M. relicta*, причем в разных рабдомах, присутствуют оба зрительных пигмента — и средневолновый (зеленый, 525–530 нм), и длинноволновый (красный, 565–570 нм), но присутствуют, при этом, в существенно разных пропорциях. В глазах озерных креветок имеется гораздо больше длинноволновых (красночувствительных) рабдомов (порядка 80%), содержащих зрительный пигмент с максимумом спектра поглощения $\lambda_{\max} \sim 560$ нм. Популяция же средневолновых (зеленочувствительных) рабдомов, содержащих зрительный пигмент с максимумом спектра поглощения $\lambda_{\max} \sim 530$ нм, намного меньше — порядка 20%. Имевшиеся в то время данные о наличии у *M. relicta* только одного опсина никак не укладывались в эти результаты. Обнаруженная же группой Доннера экспрессия двух или более генов опсинов в глазах *M. relicta* позволяет понять, почему в рабдомах каждой из популяций нами обнаруживались оба — и длинно- и средневолновые зрительные пигменты [8].

Таким образом, отличие спектров поглощения родопсина у озерной и морской популяций одного и того же вида креветок *M. relicta* связано не с разными хромофорами, а, судя по всему, с заменами аминокислотных остатков в хромофорном центре разных опсинов. Вопросы о том, какие именно это замены и каковы «сигналы» для столь «быстрой» адаптационной настройки спектров поглощения зрительных пигментов, коррелирующей со спектральным составом света среды обитания, остаются открытыми.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект №. 122041400102-9). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островский М.А., Смирнова Н.А. О длительной периодической активности морских анемонов. *Научные доклады высшей школы. Биологические науки*. 1959;1:56–59.
2. Коштыянец Х.С. *Основы сравнительной физиологии. Часть 2. Сравнительная физиология нервной системы*. Изд. АН СССР; 1957. 636 с.
3. Шуколюков С.А., Зак П.П., Каламкаров Г.Р., Калишевич О.О., Федорович И.Б., Островский М.А. Спектральная чувствительность и зрительные пигменты прибрежного краба *Hemigrapsus Sanguineus*. *Биофизика*. 1980;25(3):510–514.
4. Dontsov A.E., Fedorovich I.B., Lindström M. Comparative study of spectral and antioxidant properties of pigments from the eyes of two *Mysis relicta* (Crustacea, Mysidacea) populations, with different light damage resistance. *J. Comp. Physiol. B*. 1999;169(3):157–164.
5. Jokela-Määttä M., Pahlberg J., Lindström M., Zak P., Porter M., Ostrovskii M., Cronin T., Donner K. Visual pigment absorbance and spectral sensitivity of *Mysis relicta* (Crustacea, Mysidae) in different light environments. *J. Comp. Physiol. A*. 2005;191(12):1087–1097.
6. Feldman T., Yakovleva M., Lindström M. Eye adaptation to different light environment in two populations of *Mysis relicta*: A comparative study of carotenoids and retinoids. *J. Crustac. Biol*. 2010;30(4):636–642.
7. Абу Хамидах А.Е., Демчук Ю.В., Зак П.П., Линдстром М., Островский М.А. Коротковолновая световая фильтрация в формировании спектральной чувствительности двух популяций креветок *M. relicta* (Mysida). *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2010;(2):9–14.
8. Зак П.П., Линдстрем М., Демчук Ю.В., Доннер К., Островский М.А. Глаза креветок *Mysis relicta* (Crustacea, Mysidae) содержат два вида зрительных пигментов, локализованных в разных фоторецепторах. *Докл. Акад. наук*. 2013;449(2):240–245.
9. Belikov N., Yakovleva M., Feldman T., Demina O., Khodonov A., Lindström M., Donner K., Ostrovsky M. Lake and sea populations of *Mysis relicta* (Crustacea, Mysida) with different visual-pigment absorbance spectra use the same A1 chromophore. *PLoS One*. 2014;9(2):e88107.
10. Donner K., Zak P., Viljanen M., Lindström M., Feldman T., Ostrovsky M. Eye spectral sensitivity in fresh- and brackish-water populations of three glacial-relict *Mysis* species (Crustacea): Physiology and genetics of differential tuning. *J. Comp. Physiol. A*. 2016;202(2):297–312.
11. Feldman T., Yakovleva M., Viljanen M., Lindström M., Donner K., Ostrovsky M. Dark-adaptation in the eyes of a lake and a sea population of opossum shrimp (*Mysis relicta*): retinoid isomer dynamics, rhodopsin regeneration, and recovery of light sensitivity. *J. Comp. Physiol. A*. 2020;206(6):871–889.
12. Walls G.L. *The vertebrate eye and its adaptive radiation*. Cranbrook Institute of Science. Bulletin no. 19. Bloomfield Hills: Cranbrook Institute of Science; 1942. 785 pp.
13. Bowmaker J.K. Evolution of vertebrate visual pigments. *Vision Res*. 2008;48(20):2022–2041.
14. Lamb T.D. Evolution of the eye. Scientists now have a clear vision of how our notoriously complex eye came to be. *Sci. Amer*. 2011;305(1):64–69.
15. Островский М.А. Родопсин: эволюция и сравнительная физиология *Палеонтол. журн*. 2017;(5):103–113.
16. Островский М.А., Смитиенко О.А., Боченкова А.В., Фельдман Т.Б. Сходство и различие фотохимии родопсинов I и II типов. *Биохимия*. 2023;88(10):1847–1866.
17. Ostrovsky M.A., Sakina N.L., Dontsov A.E. Antioxidative role of eye screening pigments. *Vision Res*. 1987;27(6):893–899.
18. Dontsov A.E., Ostrovsky M.A. Ommochromes of the compound eye of arthropods from the insects and crustaceans classes: physicochemical properties and antioxidant activity. *Arthropods – New advances and perspectives*. Ed. V.D. Shields. London: IntechOpen; 2022. DOI: 10.5772/intechopen.107058.
19. Lindstrom M., Nilsson H. Eye function of *Mysis relicta* Loven (Crustacea) from two photic environments. Spectral sensitivity and light tolerance. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 1988;120 (1):23–37.
20. Audzijonyte A., Pahlberg J., Viljanen M., Donner K., Väinölä R. Opsin gene sequence variation across phylogenetic and population histories in *Mysis* (Crustacea: Mysida) does not match current light environments or visual-pigment absorbance spectra. *Mol Ecol*. 2012;21(9):2176–2196.
21. Hunt D.M., Carvalho L.S., Cowing J.A. Spectral tuning of shortwave-sensitive visual pigments in vertebrates. *Photochem. Photobiol*. 2007;83(2):303–310.
22. Dartnall H.A.J., Lythgoe J.N. The spectral clustering of visual pigments. *Vis. Res*. 1965;5(2):81–100.
23. Bridges C.D.B. The rhodopsin-porphyropsin visual system. *Handbook of sensory physiology VII/1: Photochemistry of vision*. Ed. H.J.A. Dartnall. Berlin: Springer; 1972:417–480.
24. Temple S.E., Plate E.M., Ramsden S. Seasonal cycle in vitamin A1/A2-based visual pigment composition during the life history of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol*. 2006;192(3):301–313.
25. Suzuki T., Arigawa K., Eguchi E. The effects of light and temperature on the rhodopsin-porphyropsin visual system of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Zool. Sci*. 1985;2(6):455–461.
26. Di Prima D., Reinholdt P., Kongsted J. Color tuning in bovine rhodopsin through polarizable embedding. *J. Phys. Chem. B*. 2024;128(12):2864–2873.
27. Sakmar T.P., Menon S.T., Marin E.P., Awad E.S. Rhodopsin: insights from recent structural studies. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*. 2002;31:443–484.
28. Andersson O., Paulin L., Viljanen M., Donner K. New insights into the opsin genetics of *Mysis relicta*: the potential basis of individual and population-specific spectral tuning. *VISIONARIUM XXI 2023 at Tvärminne Zoological Station, University of Helsinki, Finland, September, 24–26. 2023*.

Поступила в редакцию 06.05.2024

После доработки 15.06.2024

Принята в печать 20.06.2024

REVIEW

Molecular mechanism of adaptation to a light environment: on the issue of visual pigments spectral tuning of two populations of shrimp *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea)

M.A. Ostrovsky

¹Department of Molecular Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina st, 4, Moscow, 119334, Russia
e-mail: ostrovsky3535@mail.ru

The paper focuses on the light habitat of two populations of opossum shrimps *Mysis relicta* (Crustacea: Mysidacea) and the molecular mechanism of their visual pigments spectral tuning. Data are presented according to which spectral tuning is based on the expression of different opsins genes, and not on the replacement of chromophore groups: retinal 1 (A1) ↔ retinal 2 (A2).

Keywords: vision, rhodopsin, spectral tuning, crustaceans, comparative physiology

Funding: The research was supported by the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No. 122041400102-9.

Сведения об авторе

Островский Михаил Аркадьевич — докт. биол. наук, проф., академик РАН, зав. кафедрой молекулярной физиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: ostrovsky3535@mail.ru



Цитокины — регуляторы иммунитета

С.А. Недоспасов^{1, 2} 

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, Российская академия наук, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1;

²Научно-технологический университет «Сириус», Россия, 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д. 1

*e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Этот небольшой обзор посвящен цитокинам — молекулярным медиаторам иммунитета и многих других физиологических функций организма. Наука о цитокинах открыла новые принципы коммуникаций между клетками и новые парадигмы передачи внутриклеточного сигнала. В практической медицине нашли свое применение как некоторые рекомбинантные цитокины, так и — парадоксально — ингибиторы цитокинов.

Ключевые слова: цитокины, рецепторы, адаптеры, белок-киназы, транскрипционные факторы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-3

Введение

Цитокины — это относительно небольшие белки, с помощью которых клетки передают сигналы друг другу через специфичные рецепторы [1]. В каком-то смысле, цитокины — молекулярный язык межклеточных коммуникаций. Действие большинства цитокинов эквивалентно передаче сигналов клеточной дифференцировки, пролиферации, выживания, активации (в различных смыслах) или регулируемой клеточной гибели. Отдельное подмножество цитокинов, называемых хемотаксическими цитокинами, или хемокинами, посылает инструкции по миграции клеток в направлении источника сигнала. Несмотря на то, что в механизмах передачи сигнала цитокины родственны некоторым белковым гормонам, главное отличие состоит в том, что они продуцируются многими типами клеток (а не специализированными клетками определенного органа) и могут действовать как дистально (подобно гормонам), так и локально — паракринно или аутокринно.

Всего у человека и животных может продуцироваться порядка сотни цитокинов, и для этого в геноме имеется соответствующее число генов. Примерно такое же число генов кодирует и специфичные для каждого цитокина рецепторы (или субъединицы рецепторных комплексов). Определенное исключение составляют рецепторы хемокинов, многие из которых могут связывать несколько лигандов, и которых поэтому меньше, чем самих хемокинов.

Экспрессия генов цитокинов в продуцирующих клетках и генов рецепторов в клетках-мишенях регулируется на нескольких уровнях, что и определяет сложную программу регуляции не только иммунной системы, но и других систем и органов.

Многие цитокины были первоначально описаны как «факторы», присутствующие в различных биологических жидкостях, но до очистки индивидуальных белков, клонирования соответствующих генов, их гетерологичной экспрессии и исследования свойств рекомбинантных белков в различных системах *in vitro* и *in vivo* они едва ли могли претендовать на индивидуальные названия (имена). Отметим, что существующая классификация цитокинов далека от совершенства и в ней сочетаются как термины, идущие от первоначальных «факторов», так и более рациональные названия (такие, как интерлейкин с номером).

К старейшим цитокинам (или белкам, которых из-за особенностей сигналинга принято считать цитокинами) можно отнести интерфероны, гемопоэтические факторы дифференцировки, а также лимфотоксин и фактор некроза опухолей. Все они были описаны еще до революции в молекулярной биологии, связанной с технологией рекомбинантной ДНК. Отметим, что в 80-х гг. прошлого века значительная часть новых цитокинов и хемокинов была открыта с помощью биоинформатических методов при анализе различных экспрессионных библиотек.

Главная парадигма — в ответ на активирующие сигналы продукция цитокинов контролируется транскрипционно. После трансляции и процессинга цитокины в растворимой или мембранной форме действуют на клетки-мишени через специфичные высокоаффинные рецепторы.

Продукция практически всех цитокинов регулируется. Классический пример — их активация экспрессии через рецепторы врожденного иммунитета химическими компонентами «чужого» (бактерий, грибов или вирусов), которые принято называть «молекулярными паттернами чужого». Причем, активационные сигналы могут поступать как снаружи, через клеточные рецепторы, так и изнутри клетки — из эндосом и даже из цитоплазмы (рисунок). Главный компонент регуляции — транскрипционная активация, которая может дополняться регуляцией экспрессии на посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. Особого внимания заслуживает Интерлейкин-1 (IL-1) и его ближайшие родственники. Для секреции этих цитокинов требуется дополнительный процессинг белка-предшественника, который осуществляет каспаза-1 — единственная каспаза, не вовлеченная в регуляцию клеточной гибели. Активация неактив-

ного предшественника каспазы-1 происходит за счет самоактивации инфламماسомы — цитоплазматической белковой платформы, которая реагирует, во-первых, на внутриклеточные бактериальные инфекции, а во-вторых, на различные молекулярные «сигналы опасности».

Цитокины могут не только секретироваться, но и оставаться заякоренными на клеточной мембране — напрямую, или за счет взаимодействия с другим заякоренным белком. Передача сигналов от цитокина происходит за счет активации высокоаффинных рецепторов на клетках-мишенях. При этом, если цитокин был заякорен на мембране продуцирующей клетки, то для передачи сигнала необходим контакт между двумя клетками. Как уже отмечалось, число рецепторов цитокинов примерно такое же, как и число цитокинов. Это означает, что у большинства цитокинов есть либо свой отдельный рецептор, либо есть специфичная для (почти) каждого цитокина субъединица рецепторного комплекса. Таким образом, на уровне структуры рецепторов старая идея о вырожденности сигналов от родственных цитокинов не нашла подтверждения. Как уже отмечалось, исключение составляют хемокины, так как некоторые из них способны передавать сигнал через общий рецептор.

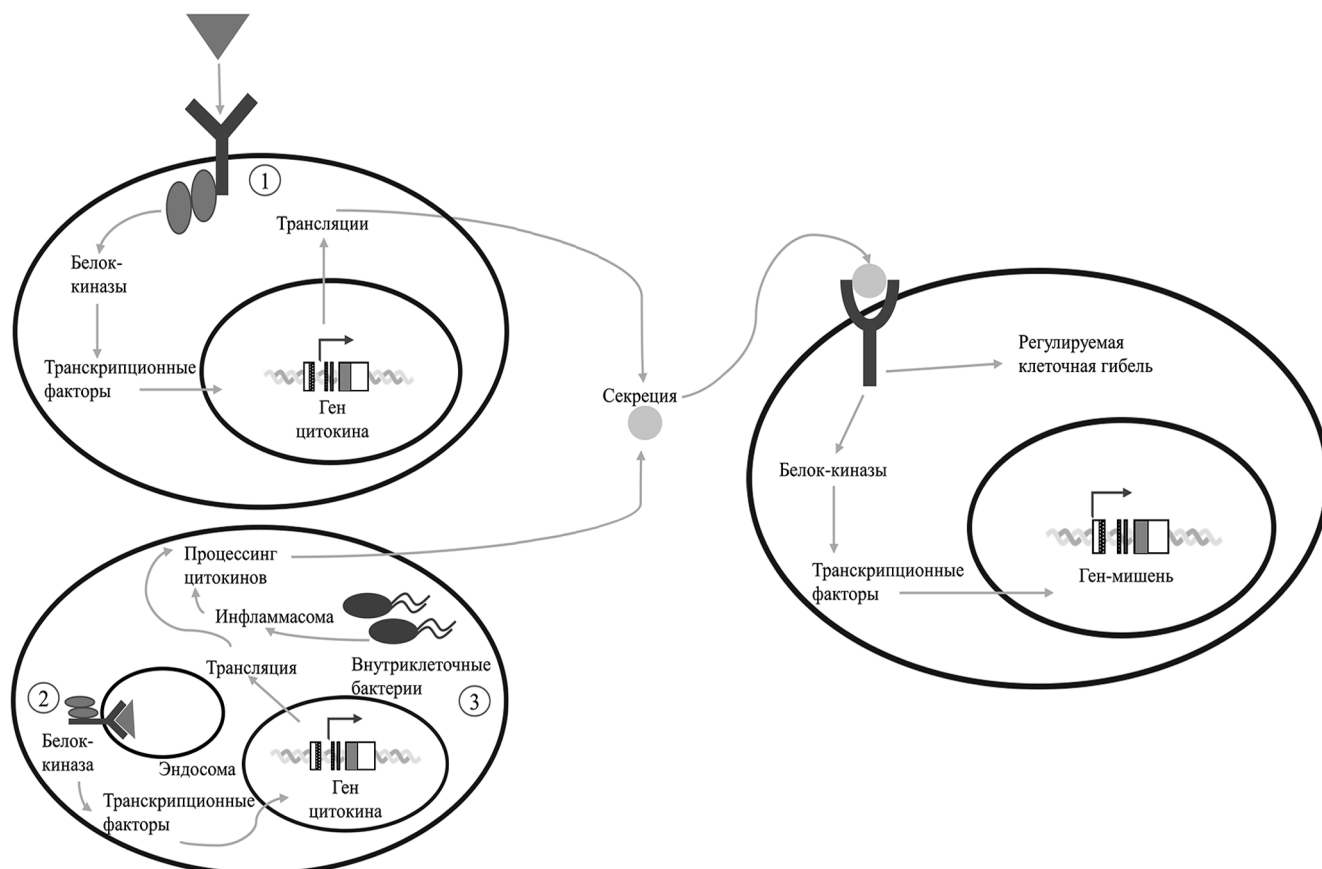


Рисунок. Схема, иллюстрирующая запуск синтеза цитокинов в ответ на активацию иммунных рецепторов и действие секретируемых цитокинов на клетку-мишень.

В левой части: 1 — внешний сигнал, действующий на клеточный рецептор; 2 — сигнал активированного рецептора в эндосоме; 3 — активация инфламماسом, которые участвуют в процессинге цитокинов семейства IL-1.

В правой части показаны главные эффекты цитокинов (за исключением хемокинов) на клетку-мишень.

Классификация и главные парадигмы передачи внутриклеточного рецепторного сигнала

Изучение механизмов передачи сигнала от рецепторов цитокинов привело к открытию нескольких новых парадигм в клеточной биологии. Оказалось, что рецепторы цитокинов подсемейства IL-1, рецепторы большого суперсемейства фактора некроза опухолей (TNF), а также рецепторы IL-17, используют белки-адаптеры, которые пристыковываются к внутриклеточной части рецептора по принципу «подобное связывается с подобным» и иницируют сборку сигнальных платформ, в которые на некотором этапе сборки вовлекаются и белок-киназы. Далее передача сигнала происходит с помощью каскадного фосфорилирования, конечным результатом которого является активация не очень большого числа транскрипционных факторов и запуск экспрессии новой панели генов. Такие последствия действия цитокинов на клетки-мишени, как пролиферация

и дифференцировка, являются следствием новой транскрипционной программы. Кроме того, некоторые рецепторы цитокинов семейства TNF способны запускать сигнал регулируемой клеточной гибели, например, апоптоз или некроптоз.

Дадим краткий обзор молекулярных механизмов передачи сигналов от разных типов рецепторов (таблица).

Цитокины семейства IL-1 используют те же белковые адаптеры, что и Toll-подобные рецепторы врожденного иммунитета, например, MyD88. Киназный каскад включает белок-киназы IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase) и IKK (I κ B Kinase). Ключевыми транскрипционными факторами, которые активирует эта группа рецепторов, являются белки семейства NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) и IRF (Interferon Regulatory Factor). Отметим, что активация NF- κ B происходит не за счет прямого фосфорилирования, а за счет деградации ингибитора I κ B (Inhibitor of κ B), которая регулируется фосфорилированием.

Таблица

Рецепторы основных семейств цитокинов

Группа рецепторов	Особенности строения	Особенности передачи внутриклеточного сигнала	Примечания	Ссылка
Для семейства IL-1	Гетеродимеры с ко-рецептором IL-1R3. Внутриклеточная часть содержит TIR-домен, гомологичный таковому у TLRs.	Инициация – через адаптер MyD88, который также содержит TIR-домен, активирует белок-киназы IRAK, IKK, транскрипционные факторы NF- κ B	Содержит рецепторы как провоспалительные, так и противовоспалительные	[2]
Для семейства TNF	Гомо- и гетеротримеры. Внеклеточная часть – цистеин-богатые повторы.	Адаптеры TRADD, FADD, RIP1 – для DD-содержащих рецепторов, TRAFs – практически для всех	DD-содержащие рецепторы способны индуцировать регулируемую клеточную гибель (апоптоз, некроптоз).	[3]
Для семейств IFN и IL-10	Гетеродимеры двух рецепторов, разные.	IFNR: Tyk1, Jak1 – киназы, STAT1-3 – предшественники транскрипционных факторов IL-10R: Jak1, Jak2 – киназы STAT-1	Семейство IFN I-типа содержит около 20 генов и псевдогенов для IFN-альфа и единственный ген для IFN-бета	[4]
Для некоторых интерлейкинов	Гетеродимеры (кроме IL-2R, являющегося гетеротримером) с общей гамма-цепью.	Каскад Jak-STAT	Ген общей гамма-цепи находится на X-хромосоме и его инактивация приводит к SCID	[5]
Для некоторых гемопоэтинов	Гетеродимеры с общей бета-цепью.	Каскад Jak-STAT		[6]
Для семейства IL-6	Гетеродимеры и гетеротримеры с общей gp130 субъединицей.	Каскад Jak-STAT	Для IL-6 дополнительные модальности сингалинга: транссингалинг	[7]
Для семейства IL-12	Гетеродимеры IL12R alpha/beta с gp130.	Каскад Jak-STAT	IL-23 использует IL-12Rbeta в комбинации с IL-23R, а IL-35 использует IL-12R beta в комбинации с gp130	[8]
Для семейства EGF	Гетеродимеры	Встроенные тирозиновые киназы	Мишени для терапии рака	[9]
Для семейства TGF-beta	Гетеротетрамеры рецепторов I и II типа	Встроенные серин-треониновые киназы	Могут взаимодействовать с другими сигнальными каскадами.	[10]
Для хемокинов	Родопсин- подобные рецепторы с 7 трансмембранными доменами	G-белки, белок-киназы, высвобождение ионов кальция.	Вырожденность: у одного и того же хемокина может быть несколько рецепторов, и несколько разных хемокинов могут передавать сигнал через один и тот же рецептор.	[11]

Рецепторы для цитокинов семейства TNF делятся на две подгруппы – на те, которые содержат, и те, которые не содержат особый белковый модуль, называемый «доменом смерти» (DD, Death Domain). Действительно, этот модуль вовлечен в некоторые (далеко не все!) механизмы регулируемой клеточной смерти, но его главная функция – рекрутировать в рецепторные комплексы другие белки (например, RIP1, Receptor-Interacting Protein 1), содержащие DD (по принципу «подобное связывается с подобным»). В результате на рецепторах, содержащих DD, собираются белковые платформы определенного состава, а на рецепторах без DD собираются другие комплексы. В обоих случаях участвуют адаптерные молекулы семейства TRAF (TNF Receptor Associated Factor). Киназный каскад в случае рецептора TNF отличается от такового для рецепторов IL-1 на начальных стадиях (нет киназы IRAK, но есть киназа Tak), но затем на уровне IKK и активации NF- κ B они становятся вырожденными. Семейство рецепторов IL-17 изучено хуже, но известно, что проксимальная часть сигнального каскада тоже использует адаптерные белки, в частности, TRAF.

Значительное число цитокиновых рецепторов используют сигнальный каскад, который состоит из тирозиновых белок-киназ семейства JAK (Janus Tyrosine Kinase; их известно 4) на рецептор-проксимальной стороне, и одного или более транскрипционных факторов семейства STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription; их известно 7) на дистальной части. Так передают сигналы интерфероны, большинство интерлейкинов (за исключением, IL-1, IL-8 и IL-18), большинство гемопоэтинов, а также гормон роста. Эти киназы в неактивном состоянии ассоциированы с внутренней частью рецепторов и активируются после связывания лиганда и конформационного изменения в молекуле рецептора. Мишенями этих белок-киназ являются предшественники 7 транскрипционных факторов семейства STAT. В отличие от белков NF- κ B активация STAT является прямым следствием фосфорилирования. Разумеется, белки STAT связываются с другими сайтами на ДНК, в сравнении с NF- κ B или IRF, поэтому в каждом случае активируются разные гены.

Несколько семейств цитокиновых рецепторов содержат во внутриклеточной части встроенные киназы – либо тирозиновые, либо серин-треониновые. В результате связывания цитокина рецептор изменяет конформацию, и при этом может активироваться встроенная белок-киназная активность, которая напрямую запускает киназные каскады (MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), Akt и JNK). Определенные мутации в молекулах рецепторов этого типа способны конститутивно активировать встроенные киназы, и тогда

рецептор может начать передавать сигнал и при отсутствии внешнего стимула. И если исходный рецептор регулировал пролиферацию определенного типа клеток, то мутантный рецептор может вызывать неоплазии.

Наконец, особняком стоит семейство рецепторов хемокинов – очень древнее семейство родопсин-подобных белков. Главная функция этих рецепторов состоит в поляризации клетки, позволяющей ей мигрировать в направлении источника хемотаксического сигнала. Хемокиновые сигналы играют важную роль при эмбриональном развитии. Физиология и функции иммунной системы не могут быть поняты без установления закономерностей перемещения иммунных клеток как на стадии дифференцировки, так и при иммунном ответе. При передаче сигнала от хемокиновых рецепторов участвуют так называемые G-белки, фосфолипаза, а также белок-киназы (отличные от тех, которые упоминались выше), причем медиаторами сигналинга является инозитолтрифосфат и диацилглицерол, а конечными мишенями являются, в частности, компоненты цитоскелета.

Медицинские применения науки о цитокинах

Значительная часть цитокинов были охарактеризована в научных лабораториях биотехнологических компаний. Причем, все вновь открытые гены и кодируемые ими белки были запатентованы с прицелом на дальнейшие медицинские приложения.

И хотя и старые, и новые цитокины показывали ожидаемую активность во многих экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo*, в качестве лекарств большинство исследованных рекомбинантных цитокинов пока так и не смогло найти своего применения. Причин тому несколько, но главная состоит в том, что сигналинг от каждого цитокина в организме строго регулируется, во-первых, во времени, во-вторых, по действию только в определенном гистологическом компартменте и, в-третьих, по концентрации. При системном введении рекомбинантного белка учесть каждое из этих обстоятельств практически невозможно. Предполагаемые перспективы здесь – разработка систем таргетной доставки. Следует также добавить, что рецепторы для некоторых цитокинов присутствуют на многих типах клеток, так что в ответ на высокие системные дозы рекомбинантных белков возможна нежелательная реакция, типа «цитокинового шторма».

На сегодняшний день в широком применении находятся рекомбинантные интерфероны I типа, несколько гемопоэтических факторов и всего лишь несколько интерлейкинов. Системное применение рекомбинантных хемокинов вряд ли возможно, так как массивный хемотаксический сигнал привел бы к дезориентации клеток, несущих соответствующие рецепторы.

Несколько неожиданной оказалась терапевтическая эффективность блокаторов некоторых цитокинов, причем таких, у которых есть функциональные гомологи. Тем самым, был опровергнут тезис о полной вырожденности функций родственных цитокинов. По-видимому, в ходе эволюции каждый из них был отобран за счет каких-то уникальных функций, при нормальных физиологических процессах, что отражается и в отдельных патологиях. Следует подчеркнуть, что для многих цитокинов существуют эндогенные ингибиторы, которые часто представляют собой растворимые высокоаффинные рецепторы (контролирующие биодоступность данного цитокина) или эндогенные антагонисты рецепторов. Оба варианта представляют собой механизмы отрицательной обратной связи, характерные для многих физиологических процессов.

Первым и наиболее ярким примером стал успех терапевтической блокировки TNF при ревматоидном артрите [12]. Интересно, что в ходе клинических испытаний блокаторов TNF была подтверждена уникальная защитная функция этого цитокина — роль в поддержании структуры гранулем, особых капсул, окружающих зараженные микобактериями клетки. А редкими случаями осложнений анти-TNF терапии стала реактивация туберкулезной инфекции у пациентов без истории клинического туберкулеза.

В клинической практике используют 5 оригинальных блокаторов TNF (все — белковой основы) и большое число дженериков. Кроме ревматоидного артрита в список заболеваний, при которых эти блокаторы активны, входит болезнь Бехтерева (анкилозирующий спондилит), некоторые воспалительные болезни кишечника, псориаз и некоторые другие аутоиммунные заболевания. Разработаны блокаторы сигналинга провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6 или IL-17 с помощью терапевтических антител, связывающих и блокирующих либо сами цитокины, либо их рецепторы.

Кроме блокировки сигнала на самом начальном этапе (взаимодействие цитокина и специфического рецептора) можно пытаться блокировать и разные этапы передачи внутриклеточного сигнала. Здесь надо помнить, что в каскаде «лиганд > рецептор > медиаторы внутриклеточного сигнала > транскрипционные факторы» специфичность действия отдельных молекул убывает по ходу этого каскада, а вырожденность их действия растет. Это означает, что малые молекулы, которые могут блокировать сигнальные белок-киназы или действовать еще «ниже», на уровне транскрипционных факторов, скорее всего, будут давать нежелательные побочные эффекты *in vivo*.

Заключение

Цитокины — ключевые медиаторы многих физиологических процессов, в первую очередь, иммунологических. Они играют центральную роль в построении иммунной системы растущего организма, и их экспрессией и эффектами регулируются многие стадии защитного иммунного ответа на инфекции. При некоторых инфекциях и заболеваниях нарушенная регуляция синтеза отдельных цитокинов лежит в основе патологических процессов. В этих случаях цитокины становятся терапевтическими мишенями, причем разработка наиболее безопасных и эффективных терапевтических стратегий остается делом будущего.

Автор благодарит Е.В. Булекову за помощь в оформлении рукописи и Е.С. Шилову за полезные критические замечания. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1067). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммунология по Ярилину: учебник, 2-е изд., испр. и доп. Под ред. С.А. Недоспасова и Д.В. Купраша. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2021. 808 с.
2. Dinarello C.A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* 2018;281(1):8–27.
3. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487–501.
4. de Weerd N.A., Nguyen T. The interferons and their receptors—distribution and regulation. *Immunol. Cell Biol.* 2012;90(5):483–491.
5. Leonard W.J., Lin J.X., O'Shea J.J. The γ_c family of cytokines: Basic biology to therapeutic ramifications. *Immunity.* 2019;50(4):832–850.
6. Hercus T.R., Kan W.L.T., Broughton S.E., et al. Role of the β common (βc) family of cytokines in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018;10(6):a028514.
7. Wang X., Lupardus P., Laporte S.L., Garcia K.C. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:29–60.
8. Vignali D.A., Kuchroo V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.* 2012;13(8):722–728.
9. Sabbah D.A., Hajjo R., Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 2020;20(10):815–834.

10. Heldin C.H., Moustakas A. Signaling receptors for TGF- β family members. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016;8(8):a022053.

11. Allen S.J., Crown S.E., Handel T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:787–820.

12. Monaco C., Nanchahal J., Taylor P., Feldmann M. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int. Immunol.* 2015;27(1):55–62.

Поступила в редакцию 27.04.2024

После доработки 03.06.2024

Принята в печать 01.07.2024

REVIEW

Cytokines – regulators of immunity

S.A. Nedospasov^{1, 2} 

¹Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, st. Ostrovityanova, 1, Moscow, 119997, Russia;

²Sirius University of Science and Technology, “Sirius” Federal Territory, Olympic Ave. 1, Krasnodar region, 354340, Russia
*e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

This short review focuses on cytokines, molecular mediators of immunity and many other physiological functions of the body. Research on cytokines revealed new principles of cell-to-cell communications and new paradigms in intracellular signal transduction. A few recombinant cytokines and, paradoxically, some cytokine inhibitors found practical use in medicine.

Keywords: cytokines, receptors, adapters, protein kinases, transcription factors

Funding: This work was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies for 2019-2027 (Agreement No. 075-15-2021-1067).

Сведения об авторах

Недоспасов Сергей Артурович – докт. биол. наук, проф., академик РАН, гл. науч. сотр. лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; проф. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ; руководитель направления «Иммунобиология и биомедицина» в НТУ «Сириус». Тел.: 8-499-135-23-11; e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com; ORCID: 0000-0001-5818-2829



Современные представления о структурной основе и молекулярных механизмах трансмембранного транспорта Cl^- в кардиомиоцитах

Я.А. Воронина^{1, 2, *} , А.М. Кархов^{1, 2} , В.С. Кузьмин^{1, 2}

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

²Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

*e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru

Внутриклеточная концентрация анионов хлора ($[\text{Cl}^-]_i$), равновесный потенциал для анионов хлора (E_{Cl}), а также трансмембранные хлорные токи (I_{Cl}) являются факторами, которые оказывают значительное влияние на электрофизиологические свойства возбудимой ткани, в том числе, миокарда. К настоящему моменту в сердце выявлено несколько типов хлорной (анионной) проводимости. В последние годы идентифицирован целый ряд трансмембранных белков, демонстрирующих хлорную проводимость (CFTR, ClC , TMEM16, LRRC8), а также подтверждена экспрессия этих макромолекул в ткани сердца. Накопленные данные позволяют установить молекулярный субстрат для некоторых хлорных анионных токов ($I_{\text{Cl,PKA}}$, $I_{\text{Cl,ir}}$, $I_{\text{Cl,vol}}$, $I_{\text{Cl,swell}}$, $I_{\text{Cl,Ca}}$, I_{to2}), обнаруживаемых в сердце. Кроме того, установлены молекулярные механизмы регуляции $[\text{Cl}^-]_i$ и E_{Cl} посредством хлорных котранспортеров (КСС, NKCC1) и хлор-бикарбонатных обменников. Множественность структур, определяющих хлорную трансмембранную проводимость, и сложность молекулярных механизмов регуляции хлорного гомеостаза лежат в основе комплексных и зачастую разнонаправленных эффектов активации хлорных переносчиков в ритмоводителе, проводящей системе и рабочем миокарде сердца. В данном обзоре рассмотрены структурные и биофизические свойства, а также молекулярная регуляция белковых комплексов — переносчиков хлора, идентифицированных в миокарде.

Ключевые слова: хлорные каналы, катион-хлорные котранспортеры, хлор-бикарбонатный обменник, хлорный транспорт, хлорные токи, электрофизиология сердца

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-4

Сокращения:

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ — внутриклеточная концентрация кальция;
 $[\text{Cl}^-]_i$ — внутриклеточная концентрация анионов хлора;
 $[\text{Cl}^-]_o$ — внеклеточная концентрация анионов хлора;
 МП — мембранный потенциал;
 CaCC — кальций-зависимые хлорные каналы;
 CCC — котранспортеры катионов и хлора (Cation Chloride Cotransporter);
 CFTR — трансмембранный регулятор муковисцидоза (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator);
 ClC — потенциал-управляемые хлорные каналы (Chloride Channels);

E_{Cl} — равновесный потенциал для анионов хлора;
 GPCR — рецепторы, сопряженные с G-белком;
 I_{Cl} — трансмембранный хлорный ток;
 $I_{\text{Cl,Ca}}$ — кальций-чувствительный хлорный ионный ток;
 $I_{\text{Cl,ir}}$ — активируемый гиперполяризацией хлорный ток с входящим выпрямлением;
 $I_{\text{Cl,PKA}}$ — PKA-зависимый хлорный ток;
 KCC — котранспортер калия и хлора;
 LRRC — белки, содержащие повторы, обогащенные лейцином (Leucine Rich Repeats Containing);
 NKCC — котранспортер калия, натрия и хлора;
 PKA — протеинкиназа А;
 PKC — протеинкиназа С;
 VRAC — анионные каналы, регулируемые объемом (Volume-Regulated Anion Channels).

1. Введение

Хлор является преобладающим неорганическим анионом в биологических системах. С середины XX в. известно, что хлор является одним из ионов, формирующих потенциал покоя и определяющих электрофизиологические свойства возбудимых клеток и тканей. Более полувека назад выяснено, что хлор является анионом, за счет которого происходит регуляция объема и осмотичности клеток.

На данный момент очевидно, что внутриклеточная концентрация анионов хлора ($[\text{Cl}^-]_i$), равновесный потенциал для анионов хлора (E_{Cl}), а также трансмембранные хлорные токи (I_{Cl}) являются факторами, которые значительно влияют на функционирование нейрональной ткани, мышечных клеток скелетной мускулатуры и гладкомышечных клеток стенки сосудов. К примеру, хлорный гомеостаз определяет возбудимость, величину потенциала покоя, тонус, сократимость, синаптическую передачу и способность к реакции на нейротрансмиттеры в различных типах ткани.

Тем не менее, молекулярные структуры, опосредующие трансмембранную анионную хлорную проводимость в клетках различного типа и в кардиомиоцитах, в частности, долгое время оставались неустановленными и, в ряде случаев, не определены до сегодняшнего момента. Этот факт лежит в основе некоторого игнорирования роли хлорного гомеостаза в физиологии определенных клеток и тканей, например, миокарда. Однако, начиная с 1980-х гг., происходит интенсивное исследование роли хлора в формировании электрической активности кардиомиоцитов. Показано, что анионы хлора и трансмембранные хлорные токи определяют конфигурацию потенциалов действия (ПД) в различных участках здорового сердца, а нарушение гомеостаза и трансмембранного переноса хлора вызывает изменение нормальной электрической активности, что приводит к сердечным патологиям и нарушениям ритма сердца.

В последние годы идентифицирован целый ряд мембранных белков, демонстрирующих хлорную проводимость. Также идентифицирован целый ряд молекул-кандидатов, которые потенциально могут осуществлять трансмембранный перенос анионов хлора. Перемещение анионов хлора через плазматическую мембрану реализуется белками трех функциональных типов: ионными каналами, обменниками и котранспортерами. В данном обзоре рассмотрены хлорные переносчики с четко установленными электрофизиологическими свойствами и молекулярной природой.

2. Трансмембранные хлорные каналы и переносчики

На данный момент свойства хлорных ионных каналов подтверждены для пяти семейств (групп) трансмембранных макромолекул. Первое семейство включает пентамерные лиганд-управляемые

анионные каналы (например, рецепторы глицина или рецепторы гамма-аминомасляной кислоты А-типа), относящиеся к классу Cys-петлевых рецепторов. К настоящему времени нет доказательств экспрессии лиганд-управляемых хлорных каналов в миокарде и/или мембране кардиомиоцитов. Единственным представителем второй группы является трансмембранный регулятор муковисцидоза (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – CFTR) – трансмембранный переносчик ABC-типа, который обладает хлорной проводимостью. Следующее (третье) семейство включает гомодимерные «двухпоровые» потенциал-управляемые хлорные каналы, обозначаемые ClC (Chloride Channels). Однако из 9 типов хлорных каналов семейства ClC , найденных у млекопитающих, только четыре являются «настоящими» каналами (ClC -1, -2, -Ka и -Kb), а остальные – Cl^-/H^+ -обменники (ClC -3, -4, -5, -6, -7). Четвертое семейство включает потенциал- и Ca^{2+} -зависимые хлорные каналы, обозначаемые CaCC [1]. В настоящее время показано, что свойствами Ca^{2+} -зависимого хлорного канала обладают гомодимерные «двухпоровые» белки TMEM16A и TMEM16B. Наконец, к пятому семейству относятся гексамерные «паннексин-подобные» анионные каналы, регулируемые объемом (Volume-Regulated Anion Channels, VRAC), которые образованы белками группы LRRC8 (белки, содержащие повторы, обогащенные лейцином – Leucine Rich Repeats Containing (LRRC) protein). В настоящее время имеется крайне мало информации касательно функционирования, распределения и регуляции VRAC-каналов, состоящих из мономеров LRRC8 в сердце.

Помимо вышеперечисленных пяти семейств, имеется целый спектр белков или макромолекулярных белковых комплексов, которые имеют признаки хлорной проводимости. Среди таких структур-кандидатов следует упомянуть бестрофины (BEST1-4), TMEM206, белки семейства TWEETY (TTYH1-3), а также белки семейства SLCO2 (SLCO2A1 – трансмембранный переносчик простагландинов). Бестрофины являются пентамерными Ca^{2+} -управляемыми хлорными каналами [2] с узким диапазоном чувствительности к внутриклеточному Ca^{2+} . Преимущественно бестрофины экспрессируемы в сетчатке. Димерные белки TWEETY также могут быть Ca^{2+} -управляемыми хлорными каналами [3]. Предполагается, что TMEM206 является основной, порообразующей субъединицей канала, проводящего pH-чувствительный, активируемый «закислением» (ASOR или PACC) хлорный ток; в свою очередь, SLCO2A1 возможно является молекулярной основой хлорного тока и каналов сверхвысокой проводимости, обозначаемых «Maxi-Cl» [4]. Имеющиеся к настоящему моменту данные о свойствах вышеперечисленных четырех

типов молекул достаточно противоречивы, а их экспрессия в миокарде надежно не установлена. В связи с этим, здесь будут рассмотрены лишь те макромолекулы, для которых подтверждена хлорная проводимость и экспрессия в сердце, а также имеются сведения, указывающие на функциональную роль этих каналов в миокарде (табл. 1). Перечень таких каналов включает CFTR, CIC-2, CaCC (TMEM16) и VRAC (LRRC8x).

2.1. Трансмембранный регулятор муковисцидоза – CFTR

Каналы CFTR относятся к большому суперсемейству АТФ-связывающих кассетных транспортеров, широко представленных во всех живых организмах [5]. АВС-транспортеры обеспечивают выведение малых органических молекул во внеклеточную среду из мембраны и цитоплазмы за счет гидролиза АТФ. Белки этого семейства имеют довольно консервативную структуру. Молекула канонического АВС-транспортера состоит из четырех доменов, два из которых являются трансмембранными, а остальные два цитозольными или нуклеотид-связывающими. Каждый из двух трансмембранных доменов содержит 6 α-спиралей. Как правило, у эукариот все четыре домена АВС-транспортера являются частью одной полипептидной цепи. CFTR относится к классу С белков АВС, для которых характерна связь четырех доменов в одну полипептидную цепь. Гомологичные части CFTR связаны друг с другом цитозольной регуляторной цепью – R-доменом [5] (рис. 1А).

Каналы CFTR в большом количестве обнаруживаются в кардиомиоцитах (рис. 1А Приложение). Для каналов CFTR характерно так называемое Гольдмановское выпрямление. Это означает, что зависимость величины тока, текущего через CFTR, от мембранного потенциала (вольт-амперная характеристика) близка к Гольдмановской (рис. 2А). Такой вид вольт-амперной характеристики указывает на отсутствие каких-либо воротных механизмов в канале CFTR. При записи электрической активности одиночных активиро-

ванных каналов CFTR наблюдаются типичные дискретные ступенчатые скачки проводимости и дискретные переходы между закрытыми и открытыми состояниями. Достаточно длительные периоды пребывания CFTR в открытом состоянии (0,1–0,2 мс) сменяются периодами закрытого состояния (1–2 мс) [6, 7].

Для того чтобы канал CFTR приобрел способность перейти в открытое состояние, необходимо, во-первых, фосфорилирование регуляторной R-цепи цАМФ-зависимой протеинкиназой (РКА) [8], а во-вторых – связывание АТФ с нуклеотид-связывающими доменами [9]. Несмотря на то, что АТФ необходим для открытия канала CFTR, внутриклеточная концентрация АТФ не является регулятором активности каналов, поскольку физиологическая регуляция проводимости каналов осуществляется за счет фосфорилирования/дефосфорилирования белка CFTR. Показано, что фосфорилирование CFTR протеинкиназой С (РКС) приводит к открытию канала CFTR [8]. По некоторым данным, полная активация CFTR возможна только при фосфорилировании РКС в дополнение к РКА [10]. На активность CFTR также могут влиять АМФ-зависимая протеинкиназа (АМПК) [11], тирозинкиназы [12] и Ca²⁺/кальмодулин-зависимые протеин-киназы (СаМК) [6]. В свою очередь, «классические» фосфатазы белков, например, фосфатаза 2А (РР2А), дефосфорилируя CFTR, снижают его проводимость и уменьшают время пребывания канала в открытом состоянии [13]. Таким образом, CFTR является типичным каналом, проводимость и величина тока которого зависят от уровня фосфорилирования. Считается, что большая часть так называемого РКА-зависимого хлорного тока (I_{Cl,РКА}) формируется каналами CFTR.

Поскольку CFTR является АВС-транспортером, целый ряд органических анионов с молекулярной массой 200–1000 Да могут блокировать CFTR. Как правило, степень блокирования зависит от величины мембранного потенциала (МП) и оказывается более выраженной при более отри-

Таблица 1

Основные характеристики хлорных ионных каналов миокарда

Каналы	CFTR	CIC2	CaCC (TMEM16A)	VRAC (LRRC8)
лиганд-управляемость	нет	нет	нет	нет
электронейтральность	нет	нет	нет	нет
избирательность	ионы галогенов	ионы галогенов	ионы галогенов	ионы галогенов, органические осмолиты
потенциал-управляемость (гейтинг)	–	+	при [Ca ²⁺] _i < 1 мкМ	–
выпрямление	Гольд-мановское	входящее	при [Ca ²⁺] _i < 1 мкМ выходящее	Гольд-мановское
кальций-чувствительность	–	–	+++	+
механочувствительность	–	+	+	+++
регуляция протеинкиназой А	+++	+	–	–
регуляция протеинкиназой С	+	–	–	–

цательных значениях МП. Потенциал-зависимость блокирующего действия наблюдается для таких соединений как флюфенаминовая кислота, глибенкламид, 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино) бензойная кислота (NPPB) [14], 3-(N-морфолино) пропансульфоновой кислота (MOPS) и антрацен-9-карбоновая кислота [6].

2.2. Семейство хлорных каналов ClC

Трансмембранные белки семейства ClC широко представлены у всех типов животных. У млекопитающих ClC экспрессируются в большинстве типов клеток и участвуют в поддержании анионного гомеостаза, потенциала покоя, а также в регуляции клеточного объема. Среди представителей

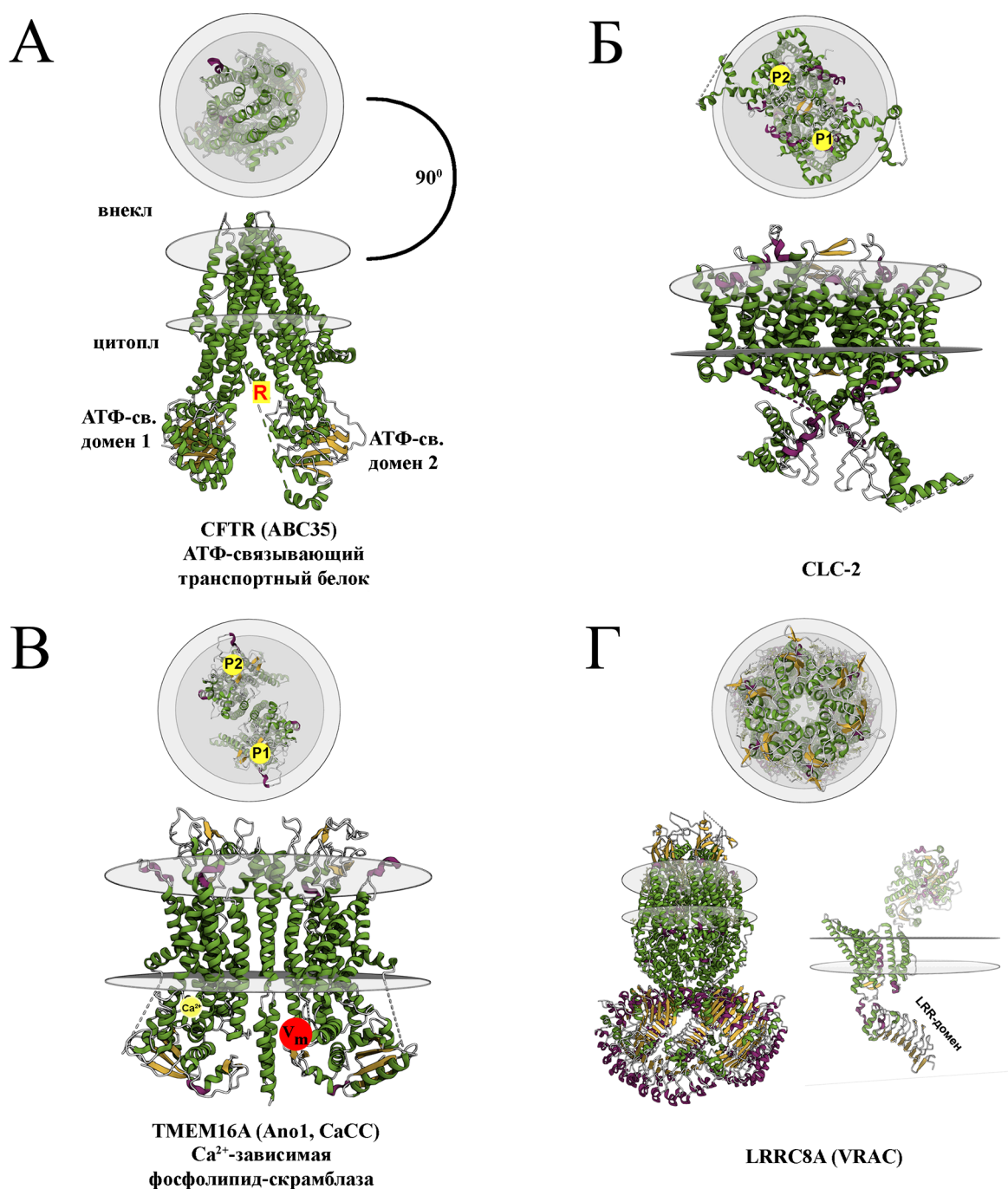


Рис. 1. Структура основных белковых комплексов, обладающих свойствами хлорных анионных каналов в миокарде. На верхних панелях показан вид канала с внеклеточной стороны в плоскости плазматической мембраны. Зеленым цветом в структуре белка показаны α -спирали, желтым цветом — β -складки, фиолетовым цветом — 3_{10} -спираль. **А.** Структура канала CFTR и его расположение в плазматической мембране с указанием АТФ-связывающих доменов и регуляторного домена (R). **Б.** Структура канала CLC-2 и его расположение в плазматической мембране с указанием ионных пор, формируемых каждой из субъединиц канала (P1 и P2). **В.** Структура канала TMEM16A и его расположение в плазматической мембране с указанием ионных пор, формируемых каждой из субъединиц канала (P1 и P2), кальций-связывающего «кармана» канала (Ca^{2+}) и потенциал-чувствительного участка канала (V_m). **Г.** Структура канала LRRC8A и его расположение в плазматической мембране с указанием домена, содержащего повторы, обогащенные лейцином (LRR). Молекулярные структуры сконструированы с помощью <https://www.rcsb.org/>

этого семейства можно выделить две структурно похожие, но функционально различные группы. К первой группе относятся потенциал-зависимые хлорные каналы (CIC-1, -2, -Ka и -Kb, K – kidney – «почечные»). CIC-1 (CICN1) является самым изученным хлорным каналом. Экспрессия CIC-1, как и CIC-Ka/b, в сердце не показана. Ко второй группе (CIC-3, -4, -5, -6, -7) относятся трансмембранные белки, которые проницаемы не только для ионов хлора, но и для протонов, и, фактически, являются Cl^-/H^+ -обменниками (антипортерами), которые в основном локализованы в мембране внутриклеточных органелл (эндосом, лизосом, везикул).

Все белки семейства CIC состоят из двух идентичных субъединиц, хотя могут образовывать и гетеродимеры [15]. Каждая из субъединиц содержит 18 α -спиралей, 17 из которых являются трансмембранными. Некоторые α -спирали являются короткими и не полностью пересекают мембрану, что приводит к появлению небольших петель внутри мембраны, которые формируют внутриканальные «пути» для анионов и протонов. С-концевой фрагмент каждой субъединицы CIC-белков содержит два эволюционно консервативных регуляторных CBS-домена, которые связывают цитоплазматический АТФ, АМФ и другие пуриновые нуклеотиды.

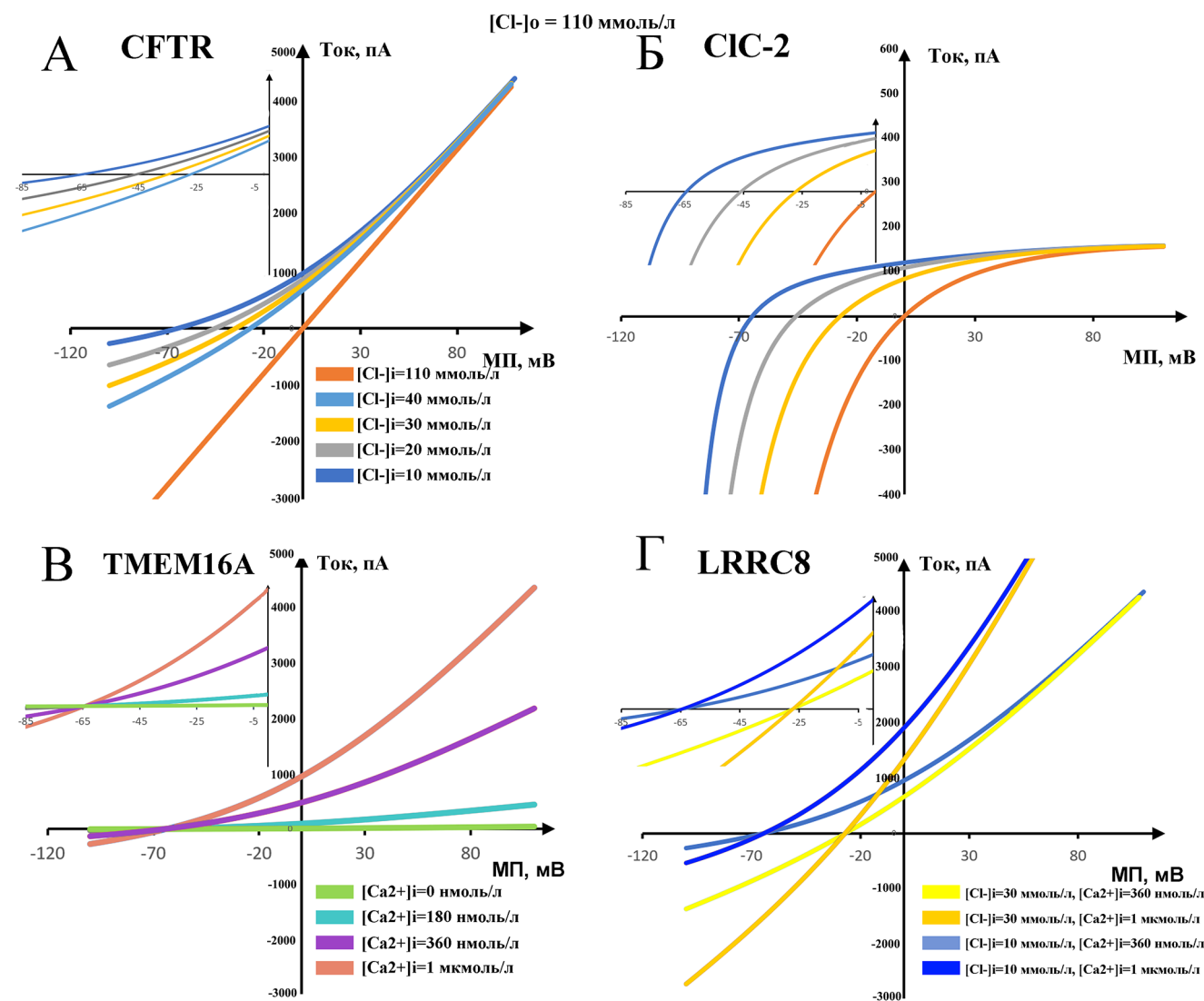


Рис. 2. Вольт-амперные характеристики основных хлорных (анионных) токов клеток миокарда при различных концентрациях внутриклеточного Cl^- ($[\text{Cl}^-]_i$) и внутриклеточного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). На вставках представлен увеличенный участок вольт-амперных характеристик с точками пересечения кривых с осью X, что соответствует равновесному хлорному потенциалу. А. РК-зависимый хлорный ток, формируемый каналом CFTR. Б. Хлорный ток аномального выпрямления, формируемый каналом CIC-2. В. Ca^{2+} -зависимый хлорный ток, формируемый каналом TMEM16A. Г. Объем-регулируемый хлорный ток, формируемый каналом LRRC8. Внеклеточная концентрация Cl^- ($[\text{Cl}^-]_o$) составляет 110 ммоль/л. Модельные кривые построены с использованием уравнения Гольдмана-Ходжкина-Каца (ГХК) для трансмембранного ионного тока. Модельные кривые для ионных токов демонстрирующих потенциал-зависимость и/или кальций-зависимость получены перемножением ГХК на равновесную вероятность пребывания канала в открытом состоянии или коэффициент, пропорциональный $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Диапазон, ограниченный кривыми для 10 и 40 ммоль/л $[\text{Cl}^-]_i$, соответствует возможным величинам ионного тока, потенциально достигаемым в кардиомиоцитах различных отделов сердца.

Важно, что трансмембранный перенос ионов хлора каждой субъединицей каналов ClC -семейства является кинетически независимым, так как каждая субъединица димерного канального комплекса формирует собственный структурно полноценный ионный путь (рис. 1Б). Следует отметить, что ионы хлора могут перемещаться внутри канала по двум траекториям вблизи цитоплазматической границы мембраны, поэтому ионный путь ClC не является «порой» в строгом смысле этого термина. Каналы ClC обладают несколькими типами воротного механизма, которые определяют их потенциал-зависимость. Предполагается, что имеются быстрый воротный механизм («быстрые активационные ворота»), определяющий индивидуальное состояние каждой «монопоры», а также медленный воротный механизм, влияющий на доступность пути обоих мономеров одновременно [16]. Высказано предположение о том, что быстрая потенциал-зависимая активация (быстрый воротный механизм) не связана с наличием потенциал-чувствительных сегментов в канальном комплексе [17]. Действительно, субъединицы и канальные комплексы ClC лишены сенсора потенциала с канонической структурой. Вероятно, механизмы потенциал-зависимой активации и деактивации значительно различаются для ClC -каналов разного типа (ClC -1, -2, -Ka и -Kb). Эта особенность выражается в том, что вольт-амперные характеристики ClC -1, -2, -Ka и -Kb имеют различный вид.

2.2.1. ClC -2

ClC -2 являются потенциал-зависимыми хлорными каналами плазматической мембраны, которые обнаруживаются в большинстве тканей млекопитающих [15]. Среди всех ClC в сердце и непосредственно в кардиомиоцитах обнаруживается высокий уровень экспрессии именно ClC -2 (рис. 1Б Приложение).

Как и другие каналы этого семейства, ClC -2 — димеры с двумя порами [18]. Для ClC -2 характерны медленные и быстрые воротные механизмы, обуславливающие потенциал-зависимость канала. Предполагается, что быстрая потенциал-зависимая активация ClC -2 обусловлена электростерическим механизмом: в тех условиях, когда $V_m < E_{\text{Cl}}$ (например, при гиперполяризации) происходит поступление внутриклеточных ионов хлора во внутренние «воротные» порообразующие области молекулы. Электростатическое отталкивание ионов хлора и поляризованного отрицательно заряженного остатка глутамата приводит к изменению положения последнего в результате разрушения одних и формирования других водородных связей («глутаматные ворота»), что делает пору доступной для перемещения анионов [16]. В тех условиях, когда $V_m > E_{\text{Cl}}$ электрическое поле препятствует поступлению внутриклеточного Cl^- в канал и пре-

одолению электростерических глутаматных ворот. Таким образом, гиперполяризация ($V_m < E_{\text{Cl}}$) приводит к активации, а деполяризация ($V_m > E_{\text{Cl}}$) к деактивации канала. Электростерический воротный механизм приводит к тому, что вольт-амперная характеристика для ClC отклоняется от «классической» кривой с Гольдмановским выпрямлением (рис. 2А) и приобретает вид кривой с направленным внутрь (или «аномальным», или «входящим») выпрямлением (“inward rectifying”, «ir»; рис. 2Б).

В связи с особенностями воротного механизма, в нативных условиях анионный ток через каналы ClC -2 является активируемым гиперполяризацией с входящим выпрямлением ($I_{\text{Cl,ir}}$). Амплитуда и потенциал реверсии (E_{Cl}) тока $I_{\text{Cl,ir}}$ зависят от концентрации ионов хлора по обе стороны мембраны. Повышение $[\text{Cl}^-]_i$ приводит к смещению E_{Cl} к менее отрицательным значениям и соответственному смещению значения МП, при котором этот канал может быть активирован и проводить деполяризующий ток — *входящий* по направлению движения положительных зарядов, но *выходящий* по направлению перемещения анионов Cl^- (рис. 2Б). При низкой $[\text{Cl}^-]_i$ ток через каналы ClC -2 приобретает сильную зависимость от внеклеточной концентрации хлора ($[\text{Cl}^-]_o$).

Состояние канала ClC -2 сильно зависит от внутриклеточного pH: небольшое снижение pH (закисление цитоплазмы, повышение $[\text{H}^+]_i$) приводит к облегчению активации канала, однако при дальнейшем снижении pH канал закрывается [19]. Механизм увеличения проводимости при снижении pH заключается в том, что протоны нейтрализуют отрицательный заряд глутамата «глутаматных ворот», облегчая поступление внутриклеточного хлора в «вестибюль» канала. Кроме того, каналы ClC -2 также могут быть активированы внутриклеточной гиперволемией [19]. Каналы ClC -2 могут быть прямой или косвенной мишенью протеинкиназ различного типа [20, 21]. Проблемой в исследовании свойств и роли ClC -2 является отсутствие их низкомолекулярных лигандов с высоким сродством и избирательностью [15].

2.3. Ca^{2+} -чувствительные хлорные каналы — CaCC

Как указано выше, структуры, обладающие хлорной проводимостью, потенциал-зависимостью и чувствительностью к Ca^{2+} , обозначают как CaCC . Хлорный ионный ток, демонстрирующий потенциал- и Ca^{2+} -чувствительность, формируемый CaCC , принято обозначать как $I_{\text{Cl,Ca}}$. Ранее считалось, что молекулярной основой CaCC являются гомодимерные канальные белки, где каждый мономер состоит из 8 трансмембранных сегментов (α -спиралей) [1]. Такие белки были названы аноксинами (Ano) [22–23]. Однако в недавних исследованиях [24–26] установлено, что каждый мономер порообразующей субъединицы CaCC включает

10 трансмембранных α -спиралей. Белки такого типа ранее получили обозначение TMEM16, как одно из семейств слабо похожих трансмембранных белков с неизвестной функцией, объединяемых в группу TMEM (TransMEmbraNe MembeRs). На данный момент нет никаких сомнений, что гомодимеры TMEM16A (Ano1) или TMEM16B (Ano2) являются молекулярными субстратами для CaCC и порообразующими субъединицами для тока $I_{Cl,Ca}$ [27]. Каждый из мономеров гомодимерного канала TMEM16 имеет пору, проницаемую для ионов хлора. Таким образом, CaCC являются «двухпоровыми» каналами (рис. 1В). Каналы TMEM16A/B широко экспрессируются в кардиомиоцитах мышей, собак, [28], кроликов [29] и свиней [30]. Уровень экспрессии TMEM16 в миокарде человека, в отличие от других млекопитающих, невысок (рис. 1В Приложение) [31].

Проводимость каналов TMEM16A, экспрессируемых в гетерологических системах, увеличивается при деполяризации, но снижается при гиперполяризации, поэтому ток $I_{Cl,Ca}$ демонстрирует свойства тока *выходящего* выпрямления (рис. 2В) [32]. Однако основной особенностью CaCC/TMEM16A является регуляция его проводимости цитозольным Ca^{2+} [33].

Каждый из димеров канала CaCC/TMEM16A может связывать два иона Ca^{2+} . Связывание, по-видимому, происходит кооперативно [34–35]. Однако в структуре TMEM16A не обнаружено канонических Ca^{2+} -связывающих мотивов. Предполагается, что последовательность аминокислот в первой внутриклеточной петле образует «кальциевый карман» (рис. 1В), характерный, например, для Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов большой проводимости (BK, Big Potassium) [1]. Отрицательно заряженные остатки аминокислот «кальциевого кармана» TMEM16A обращены в «просвет» проводящей поры [36].

Считается, что потенциал-чувствительность CaCC/TMEM16A обусловлена прямым потенциал-зависимым связыванием Ca^{2+} отрицательно заряженными аминокислотными остатками «кальциевого кармана» [24–25]: чем более положительнее потенциал, тем более эффективно ионы Ca^{2+} проникают из цитоплазмы в Ca^{2+} -связывающий карман, нейтрализуя негативный электростатический заряд в поре и делая ее доступной для ионов хлора. Кроме того, чем выше $[Ca^{2+}]_i$, тем больше каналов TMEM16A будет активировано. Таким образом, потенциал-чувствительность и зависимость от $[Ca^{2+}]_i$ для CaCC/TMEM16A являются связанными характеристиками. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ приводит к увеличению как входящей, так выходящей компоненты тока через CaCC/TMEM16A (рис. 2В).

Тем не менее, $I_{Cl,Ca}$ при низкой (базальной, $<0,1$ мкМ) $[Ca^{2+}]_i$, соответствующей состоянию покоя клетки, также может быть потенциал-зави-

симо активирован [37]. Считается, что потенциал-зависимость CaCC/TMEM16A при нулевой или очень низкой $[Ca^{2+}]_i$ обусловлена либо наличием у канала отдельного «неканонического» Ca^{2+} -независимого сенсора потенциала (рис. 1В), либо – потенциал-зависимым протонированием аминокислотных остатков Ca^{2+} -связывающего кармана и других цитоплазматических участков молекулы [38]. Закисление цитоплазмы приводит к увеличению вероятности пребывания TMEM16A в открытом состоянии и увеличению $I_{Cl,Ca}$ при всех значениях МП [39]. Помимо прочего, проводимость TMEM16A и величина $I_{Cl,Ca}$ зависит от $[Cl^-]_o$. В итоге, механизм активации каналов TMEM16A крайне сложен, поскольку определяется $[Ca^{2+}]_i$, мембранным потенциалом, внутриклеточным pH и $[Cl^-]_o$; канал CaCC/TMEM16A нельзя, в строгом смысле, определить как *потенциал-управляемый*. В свою очередь, наличие потенциал-чувствительности при нулевой $[Ca^{2+}]_i$ не позволяет рассматривать канал и как *лиганд-управляемый*.

Установлено, что активация CaCC/TMEM16A происходит за счет Ca^{2+} , поступающего через потенциал-зависимые кальциевые каналы, неселективные катионные каналы, а также при высвобождении Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума [40]. TMEM16B менее чувствителен к Ca^{2+} , чем TMEM16A, а кинетика Ca^{2+} -зависимой активации и деактивации TMEM16B намного быстрее, чем у TMEM16A [22, 41]. Следует отметить, что после активации кальцием для TMEM16A/B не наблюдается инактивации канала со временем.

CaCC/TMEM16A является мишенью целого ряда внутриклеточных сигнальных молекул и киназ [37]. Комплекс Ca^{2+} /кальмодулин активирует TMEM16A [42–43]. Как и в случае со многими другими каналами, фосфолипиды (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат) и производные холестерина [44] оказывают существенное влияние на способность CaCC/TMEM16A к активации [45]. В некоторых работах выявлена чувствительность TMEM16A к механическим стимулам [46]. Для CaCC/TMEM16A показана активация, опосредованная G-белок сопряженными рецепторами (GPCR) [33, 35].

Показано, что классические блокаторы анионной проводимости – DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid), NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) и 9-AC (9-anthracene carboxylic acid) [1] обладают блокирующим действием относительно CaCC/TMEM16. В ряде исследований показано, что такие соединения как T16inh-A0, CaCCinh-A01, бензбромарон, дихлорфен и гексахлорфен могут быть блокаторами TMEM16A [47, 49]. Предполагается, что высокоселективным ингибитором TMEM16A является N-((4-метокси)-2-нафтил)-5-нитроантрапиловая кислота (MONNA) [50].

2.4. Хлорные каналы, регулируемые внутриклеточным объемом (VRAC), – LRRC8x

Молекулярный субстрат для трансмембранной анионной проводимости, регулируемой объемом, долгое время не был установлен. В литературе имеется множество вариантов обозначения предполагаемых «объем-чувствительных» каналов, например, VSOR (чувствительные к объему каналы выходящего выпрямления), VSOAC (чувствительные к объему каналы анионов/органических осмолитов) или VRAC (регулируемые объемом анионные каналы), которые представляют собой гомо- или гетерогексамеры, сформированные трансмембранными белками семейства LRRC8.

Гетерогексамеры LRRC8 могут включать мономеры пяти разных типов: LRRC8A...E [51]. Все LRRC8 имеют трансмембранный порообразующий домен, который состоит минимум из четырех трансмембранных α -спиралей и в высокой степени гомологичен трансмембранному домену коннексинов и иннексинов. Предполагается, что филогения LRRC8 связана с паннексинами и другими белками щелевых контактов [52]. Помимо трансмембранного домена, каждая молекула белка LRRC8 имеет внеклеточный домен и внутриклеточный, С-концевой домен, богатый лейциновыми повторами (LRR) с характерной третиной структурой (рис. 1Г) [53]. Биофизические свойства каналов-гексамеров зависят от их субъединичного состава [54–55].

Белок LRRC8A, также известный как Swell1, является обязательной субъединицей гексамерного канала VRAC/LRRC8 [56–57]. Функциональный канал представляет собой гетеромер, включающий LRRC8A и любые другие мономеры (LRRC8B, C, D или E) [15]. Подавление экспрессии LRRC8A приводит к уменьшению активируемого гиперволемией хлорного тока ($I_{\text{Cl,vol}}$), однако элиминация любой другой из субъединиц не влияет на этот ток [57–58].

Установлено, что VRAC/LRRC8 экспрессируются во всех типах клеток позвоночных животных, в том числе и в кардиомиоцитах (рис. 1Г Приложение). Показано, что в сердце в наибольшей степени экспрессируется LRRC8C [59]. Кардиомиоциты человека экспрессируют LRRC8A, LRRC8B, LRRC8C и LRRC8E.

Считается, что эти каналы играют ключевую роль в поддержании клеточного объема [51]. Проводимость вышеуказанных каналов увеличивается в ответ на гиперволемия и (гипо)осмотический стресс, что способствует возвращению клеток к исходному объему и исходной осмолярности за счет регулируемого выхода из цитоплазмы ионов галогенов и отрицательно заряженных органических осмолитов. Считается, что восстановление клеточного объема реализуется за счет пассивного трансмембранного, направленного наружу пере-

мещения молекул воды, происходящего вслед за активацией VRAC/LRRC8 [52].

Хлорный анионный ток через каналы VRAC/LRRC8, обозначаемый как $I_{\text{Cl,vol}}$ или $I_{\text{Cl,swell}}$, имеет входящую и выходящую компоненты и демонстрирует свойства выходящего выпрямления, близкого к Гольдмановскому (рис. 2Г). Для $I_{\text{Cl,vol}}$ характерна инактивация со временем, наблюдаемая при положительных значениях МП. Выраженность этой инактивации зависит от типа белков LRRC, формирующих ионный канал [51]. Анионная избирательность VRAC/LRRC8 обусловлена высоким положительным электростатическим зарядом проводящего пути канала.

Проводимость VRAC/LRRC8 зависит от концентрации внутриклеточного АТФ, pH цитоплазмы, а также от $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [61–62]. Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ способствует увеличению проводимости VRAC при всех значениях МП (рис. 2Г). При снижении pH от 7,4 до 6 проводимость увеличивается, однако дальнейшее снижение pH подавляет VRAC/LRRC8.

VRAC/LRRC8 являются мишенью киназ, сопряженных с GPCR [63]. Фосфорилирование киназами PKC α и PKC β усиливает активацию VRAC/LRRC8 каналов внутриклеточным АТФ [64]. Проводимость VRAC/LRRC8 модулируется пуриновыми рецепторами P_2Y_2 -типа [65]. Также известно, что ингибирование киназы легких цепей миозина подавляет проводимость, а ингибирование фосфатазы легких цепей миозина увеличивает проводимость VRAC/LRRC8 [51]. Кроме того, ингибирование Rho/Rho-киназного пути приводит к нарушению активации VRAC/LRRC8 вплоть до их полного подавления проводимости [66].

3. Транспортёры и обменники хлора

Наряду с хлорными каналами в сердце широко представлены хлорные трансмембранные АТФ-независимые переносчики и обменники, которые определяют $[\text{Cl}^-]_i$ и, соответственно, E_{Cl} , оказывая влияние на электрофизиологические характеристики миокарда (табл. 2). В настоящее время известно множество хлор-катионных и хлор-анионных трансмембранных переносчиков, которые могут быть как электронейтральными, так и электрогенными. Ключевую роль среди хлор-катионных ко-транспортёров (или симпортеров) в сердце играют NKCC и KCC, относящиеся к крупной группе трансмембранных молекул SLC12 (SoLute Carrier) [67]. Среди хлор-анионных транспортёров в сердце важны хлор-бикарбонатные антипортеры или иначе $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменники [68], являющиеся членами семейств SLC4 или SLC26 [15].

3.1. Котранспортёры катионов и хлора

Котранспортёры катионов и хлора (CCC – Cation Chloride Cotransporter) обеспечивают трансмембранный электронейтральный симпорт Cl^- и K^+ или Na^+ . Семейство SLC12 включает

единственный котранспортер SLC12A3, переносящий один Na^+ и один Cl^- (NCC), два котранспортера (SLC12A2 – NKCC1 и SLC12A1 – NKCC2), которые осуществляют одновременный (однонаправленный) перенос Na^+ , K^+ и двух Cl^- (NKCC), а также четыре котранспортера, осуществляющие однонаправленный перенос K^+ и Cl^- (KCC, SLC12A4 – KCC1, SLC12A5 – KCC2, SLC12A6 – KCC3, SLC12A7 – KCC4) [69]. Структура всех CCC (SLC12) сходна – мономер котранспортера включает 12 трансмембранных α -спиралей и крупные внутриклеточные N- и C-концевые до-

мены [70] (рис. 3). Все котранспортеры этого семейства, за исключением KCC4, являются димерами [67, 71].
Активность CCC находится под тесным контролем со стороны множества регуляторных факторов, например, агонистов GPCR. Более того, полученные к настоящему времени данные указывают на тканеспецифичный характер регуляции CCC со стороны рецепторов и их внутриклеточных сигнальных каскадов [72, 73]. Например, в изолированных гладкомышечных клетках аорты крысы увеличение концентрации цАМФ при стимуляции

Таблица 2

Основные характеристики котранспортеров и обменников хлора в миокарде

Транспортеры	Котранспортеры		Обменники	
	NKCC1	KCC1	HCO ₃ ⁻ /Cl ⁻ -обменник	
	SLC12A2	SLC12A4	SLC4A	SLC26A
Стехиометрия	1Na ⁺ :1K ⁺ :2Cl ⁻ (все ионы внутрь)	1K ⁺ :1Cl ⁻ (все ионы наружу)	1HCO ₃ ⁻ (наружу):1Cl ⁻ (внутри)	nHCO ₃ ⁻ (наружу):1Cl ⁻ (внутри) или 1HCO ₃ ⁻ (наружу):2Cl ⁻ (внутри) или 1HCO ₃ ⁻ (наружу):1Cl ⁻ (внутри)
Электронейтральность	+	+	+	+/-
Потенциал-зависимость	+	+	-	-
Механочувствительность	активация при уменьшении объема клетки	активация при увеличении объема клетки	-	-
Зависимость от [Cl ⁻] _i	повышение [Cl ⁻] _i подавляет NKCC	повышение [Cl ⁻] _i подавляет KCC	-	-

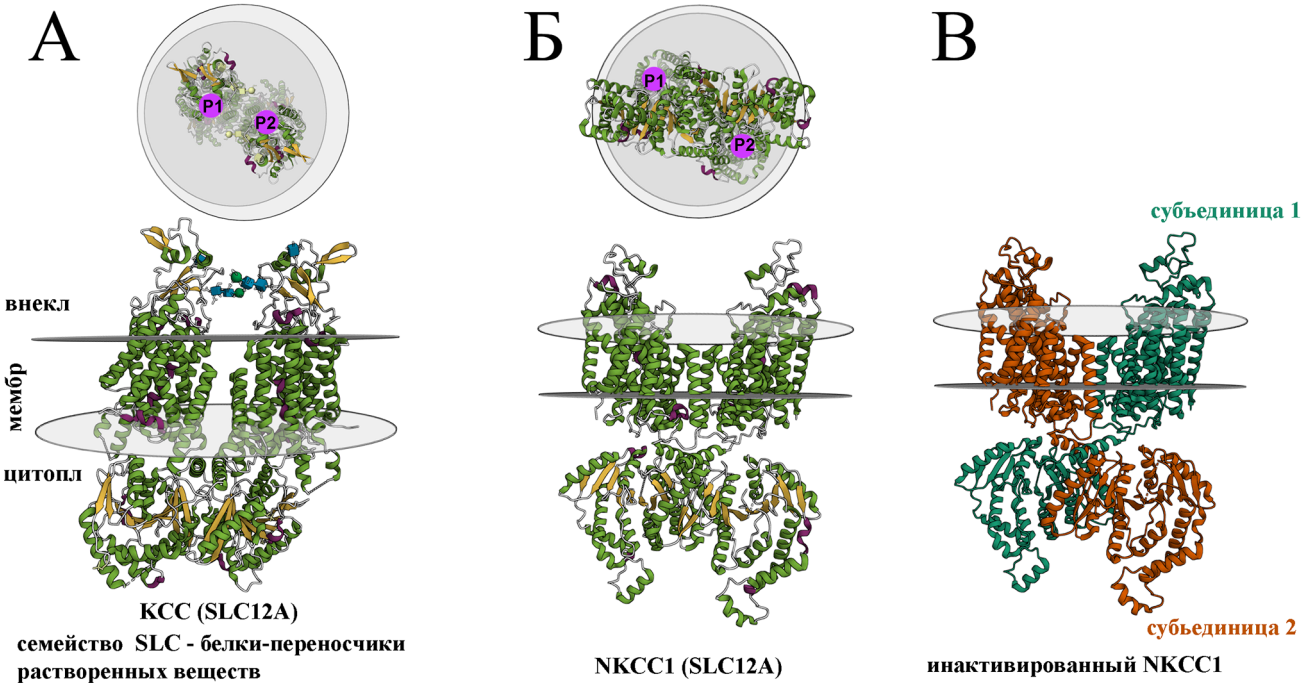


Рис. 3. Структура хлорных трансмембранных котранспортеров (симпортеров). На верхних панелях показан вид транспортеров с внеклеточной стороны в плоскости плазматической мембраны. Зеленым цветом в структуре белка показаны α -спирали, желтым цветом – β -складки, фиолетовым цветом – 3_{10} -спираль. **А.** Структура котранспортера катионов калия и анионов хлора (KCC) семейства SLC12A с указанием пор или анионных проводящих путей, формируемых каждой субъединицей димера (P1 и P2). **Б.** Структура котранспортера катионов калия, натрия и анионов хлора (NKCC1) семейства SLC12A с указанием пор или анионных проводящих путей, формируемых каждой субъединицей димера (P1 и P2). **В.** Взаиморасположение субъединиц инактивированного транспортера NKCC1. Молекулярные структуры сконструированы с помощью <https://www.rcsb.org/>

β -адренорецепторов и аденилатциклазы (АЦ) вызывает подавление активности НКСС1, тогда как повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ увеличивает его активность [74–75]. В то же время, повышение внутриклеточной концентрации цГМФ в гладкомышечных клетках не оказывает влияния на НКСС1, но повышает активность КСС [76].

Котранспортеры семейства ССС имеют сайты фосфорилирования для протеинкиназ различного типа. [77] Действительно, фосфорилирование серин-треониновыми киназами семейства WNK влияет на активность ССС [67]. Фосфорилирование НКСС1-2 и НСС киназами семейства WNK приводит к увеличению активности этих переносчиков. В свою очередь, фосфорилирование КСС 1–4 этими киназами приводит к подавлению активности транспортеров [78]. Таким образом, регуляция активности НКСС и КСС является реципрокной. Парадоксально, но в целом ряде работ установлено, что «классические» серин-треониновые киназы – РКА и РКС не оказывают влияния на НКСС и КСС [77].

Изменение клеточного объема влияет на активность ССС. Уменьшение объема клетки («сжатие»), снижение натяжения клеточной мембраны, например, при увеличении осмолярности внешней среды, приводит к активации НКСС, но подавляет КСС. Увеличение проводимости НКСС в таких условиях приводит к поступлению Na^+ , K^+ и Cl^- в цитоплазму, увеличению концентрации внутриклеточных осмолитов и восстановлению объема клетки при действии гиперосмотического шока.

Наоборот, увеличение объема клетки, например, в результате уменьшения осмолярности внеклеточной среды, набухание клетки и растяжение мембраны приводит к увеличению проводимости КСС, в результате чего $[\text{K}^+]_i$ и $[\text{Cl}^-]_i$ снижается, а действие гипосмотического шока на клетку ослабляется и происходит восстановление объема клетки [78, 79].

Таким образом, как и каналы VRAC/LRRC8, котранспортеры КСС, НКСС принимают участие в регуляции объема, поддержании ионного и осмотического гомеостаза клеток. Котранспортеры НКСС и КСС, таким образом, являются важным элементом системы регуляции клеточного объема. КСС и НКСС работают реципрокно – действие НКСС обратное эффектам КСС. За счет регуляции объема КСС и НКСС участвуют в регуляции клеточной пролиферации [78]. Следует отметить, что активность ССС зависит от $[\text{Cl}^-]_i$. Например, повышение $[\text{Cl}^-]_i$ подавляет НКСС, но стимулирует КСС [80].

Фармакология ССС хорошо развита, поскольку эти котранспортеры являются мишенями «петлевых диуретиков» – соединений, применяемых в терапии артериальной гипертензии. Наиболее известным петлевым диуретиком является фурос-

семид, который, наряду с другими мишенями, блокирует работу НКСС2 в проксимальных извитых канальцах, подавляя реабсорбцию натрия и стимулируя выведение воды [81–82].

3.1.1. Котранспортеры K^+ и Cl^- – КСС

Котранспортеры КСС опосредуют электронейтральный Na^+ -независимый перенос ионов K^+ и Cl^- через плазматическую мембрану. КСС обнаружен практически во всех тканях – эпителии, нейронах и других клетках мозга, почках, скелетных мышцах и сердце (рис. 2А Приложение) [83].

Транскрипты всех четырех типов переносчиков КСС обнаруживаются в сердце, однако только КСС1, КСС3 и КСС4 экспрессируются на уровне белка [79, 84]. Транскриптомный анализ одиночных клеток, выделенных из различных отделов сердца человека (левое и правое предсердие, левый и правый желудочек, верхушка желудочка, межжелудочковая перегородка), позволяет заключить [67], что повсеместно экспрессируемым транспортером почти во всех типах клеток сердечной ткани является КСС1, в то время как КСС3 и КСС4 обнаруживаются только в желудочковых кардиомиоцитах. Таким образом, удаление Cl^- из кардиомиоцитов преимущественно реализуется изоформой КСС1, как и в большинстве клеток и тканей организма млекопитающих животных. Тем не менее, профиль экспрессии КСС является видоспецифичным. Уровень транскриптов КСС2 в сердце человека крайне низок [85–86]. Однако КСС2 обнаруживается в желудочковых кардиомиоцитах сердца курицы, где, вероятно, способствует снижению $[\text{Cl}^-]_i$ при стимуляции β -адренорецепторов [87].

3.1.2. Котранспортеры K^+ , Na^+ и Cl^- – НКСС

Котранспортеры НКСС опосредуют электронейтральный перенос ионов Na^+ , K^+ и двух Cl^- через плазматическую мембрану. Котранспортеры НКСС экспрессируются повсеместно [67].

В норме НКСС1 обнаруживается во всех областях сердца как на уровне мРНК, так и на уровне белка [84, 86]. К настоящему времени подтверждения экспрессии «почечной» изоформы НКСС2 (SLC12A1) в сердце отсутствуют [70]. Как и в случае с КСС, перенос Cl^- в кардиомиоциты осуществляется повсеместно экспрессируемой изоформой НКСС, то есть НКСС1 (рис. 2Б Приложение).

Транспортеры КСС и НКСС связаны не только функционально, но и на уровне регуляции экспрессии их генов: у мышей, нокаутных по КСС3, наблюдается снижение экспрессии НКСС1. Реципрокное ослабление экспрессии НКСС у КСС-нокаутных, видимо, способствует компенсаторному снижению $[\text{Cl}^-]_i$. Однако компенсация, видимо, происходит не полностью, так как у КСС-нокаутных наблюдаются ряд патологических изменений в сердечно-сосудистой системе, включая гипертрофические изменения миокарда [88].

3.2. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменники

Хлор-бикарбонатные обменники сердца относятся к двум различным семействам: SLC4A и SLC26A. Семейство SLC4A включает в себя Na^+ -зависимые $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменники (NDCBE и NCBE) и Na^+ -независимые $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменники (AE1 (SLC4A1), AE2 (SLC4A2) и AE3 (SLC4A3)). Семейство SLC26A включает в себя пять различных $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменников (SLC26A3, пендрин, SLC26A6, SLC26A7 и SLC26A9). На данный момент в сердце показана экспрессия электронейтральных обменников AE1-3, а также обменников SLC26A3 и SLC26A6 [68, 89]. Однако сведения о том, какой обменник является в сердце основным, противоречивы. Вероятно, профиль экспрессии вышеперечисленных обменников видоспецифичен, различается в определенных отделах сердца и меняется в ходе онтогенеза. Например, экспрессия AE1 в сердце мышей сильно снижается в ходе пренатального онтогенеза [89].

Обменники AE1-3 (SLC4A1-3) являются гомодимерами, мономер которых состоит из трех доменов: цитоплазматического N-концевого домена, трансмембранного домена и цитоплазматического C-концевого домена (рис. 4А). Наиболее известным и изученным $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменником является SLC4A1 (AE1, Band 3) — хлор-бикарбонатный обменник плазматической мембраны эритроцитов. В зрелом миокарде AE3 практически не обнаруживается.

Обменник AE2 экспрессируется в большинстве тканей. Экспрессия AE2 в сердце довольно низкая, а его наличие в кардиомиоцитах на данный момент остается неподтвержденным [68]. AE3 считается $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменником возбудимых тканей, поскольку он экспрессируется только в сердце, мозге и сетчатке (рис. 2А Приложение) [90]. В нескольких работах показано, что уровень мРНК AE3 (SLC4A3) в сердце достаточно высок [91]. Таким образом, AE3 является основным электронейтральным хлор-бикарбонатным обменником в сердце и локализуется в основном в плазматической мембране, формирующей Т-трубочки. Интересно, что в кардиомиоцитах, помимо присутствия AE3 в плазматической мембране, показано наличие данного обменника в мембране цистерн саркоплазматического ретикулума [92].

Хлор-бикарбонатные обменники SLC26A также являются димерами, каждый мономер которого включает 10–14 трансмембранных сегментов [93] (рис. 4Б). По разным литературным данным, обменники SLC26A кардиомиоцитов (рис. 2Г Приложение) могут быть либо электрогенными (со стехиометрией $2\text{HCO}_3^-:1\text{Cl}^-$), либо электронейтральными [94]. Так же как и AE3, SLC26A [89] обнаруживается в мембране Т-трубочек и саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов [92]. За счет способности перемещать анионы либо в клетку, либо из клетки основной функцией $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменников является регуляция цитоплазматического pH [95].

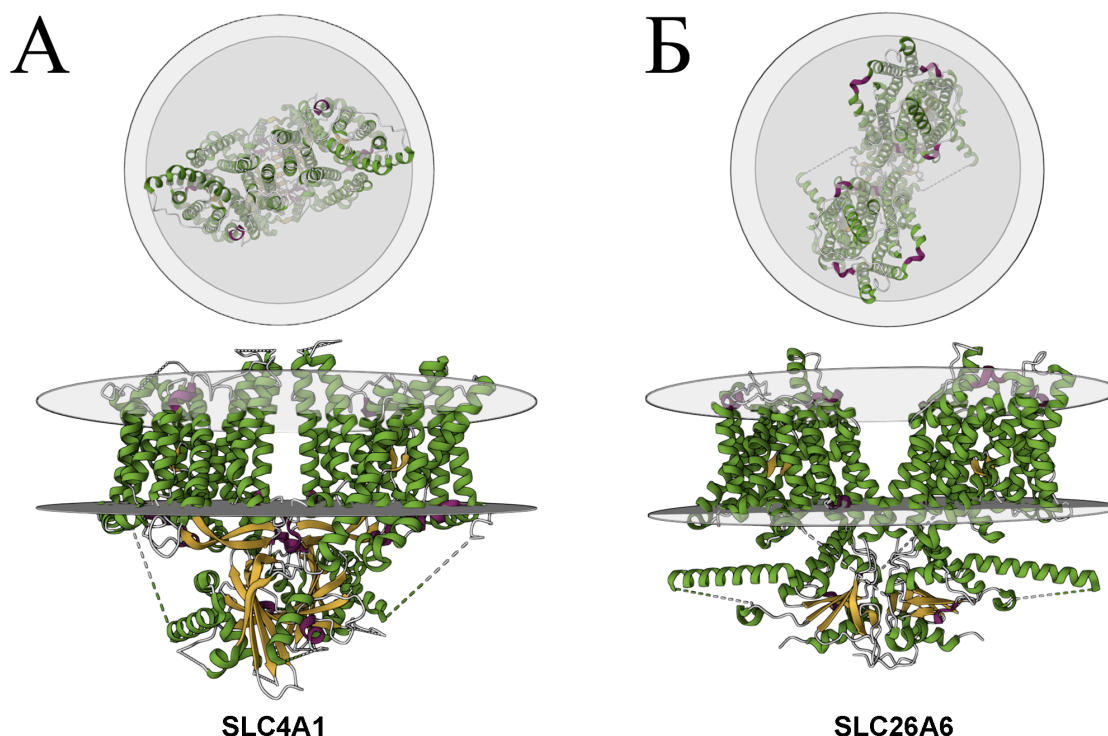


Рис. 4. Структура хлор-бикарбонатных трансмембранных обменников (антипортеров). На верхних панелях показан вид обменников с внеклеточной стороны в плоскости плазматической мембраны. Зеленым цветом в структуре белка показаны α -спирали, желтым цветом — β -складки, фиолетовым цветом — 3_{10} -спираль. А. Структура натрий-независимого хлор-бикарбонатного обменника AE1 (SLC4A1) и его расположение в плазматической мембране. Б. Структура хлор-бикарбонатного обменника SLC26A6 и его расположение в плазматической мембране. Молекулярные структуры сконструированы с помощью <https://www.rcsb.org/>

4. Заключение

Хлорные каналы семейств ClC , TMEM16 , CFTR , LRRC8 являются молекулярным субстратом хлорных ионных токов, обнаруженных в сердце. Вследствие множественности и сложности регуляции хлорная проводимость оказывает комплексное влияние на электрическую активность сердца, зачастую разнонаправленное для разных его отделов. Тем не менее, хлорные каналы и хлорные переносчики принципиально важны для нормального функционирования пейсмекера, проводящей системы и сократительного миокарда сердца. Несмотря на целый спектр установленных эффектов, в значительной степени роль баланса хлора и хлорной проводимости в электрофизиологии сердца

остается неисследованной. В частности, необходимо прояснение вопроса об уровне цитоплазматического Cl^- в кардиомиоцитах проводящей системы сердца. Критически важным является идентификация профиля экспрессии хлорных ионных каналов при сердечных патологиях различного типа, поскольку это позволит установить новые аспекты электрического ремоделирования миокарда и определить новые мишени для фармакологической терапии нарушений ритма сердца.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №22-15-00189). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duran C., Thompson C.H., Xiao Q., Hartzell H.C. Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable. *Annu. Rev. Physiol.* 2009;72:95–121.
2. Miller A.N., Vaisey G., Long S.B. Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin. *Elife*. 2019;8: e43231.
3. Li B., Hoel C.M., Brohawn S.G. Structures of twety homolog proteins TTYH2 and TTYH3 reveal a Ca^{2+} -dependent switch from intra- to intermembrane dimerization. *Nat. Commun.* 2021;12(1):6913.
4. Okada Y., Sabirov R.Z., Merzlyak P.G., Numata T., Sato-Numata K. Properties, structures, and physiological roles of three types of anion channels molecularly identified in the 2010's. *Front. Physiol.* 2021;12: 805148.
5. Locher K.P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016;23(6):487–493.
6. Csanády L., Vergani P., Gadsby D.C. Structure, gating, and regulation of the CFTR anion channel. *Physiol. Rev.* 2019;99(1):707–738.
7. Tabcharani J.A., Rommens J.M., Hou Y.X., Chang X.B., Tsui L.C., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature*. 1993;366(6450):79–82.
8. Berger H.A., Anderson M.P., Gregory R.J., Thompson S., Howard P.W., Maurer R.A., Mulligan R., Smith A.E., Welsh M.J. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J. Clin. Invest.* 1991;88(4):1422–1431.
9. Anderson M.P., Berger H.A., Rich D.P., Gregory R.J., Smith A.E., Welsh M.J. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*. 1991;67(4):775–784.
10. Jia Y., Mathews C.J., Hanrahan J.W. Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 1997;272(8):4978–4984.
11. Hallows K.R., Raghuram V., Kemp B.E., Witters L.A., Foscett J.K. Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J. Clin. Invest.* 2000;105(12):1711–1721.
12. Billet A., Jia Y., Jensen T., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion channel by tyrosine phosphorylation. *FASEB J.* 2015;29(9):3945–3956.
13. Luo J., Pato M.D., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1998;274(5):C1397–C1410.
14. Uramoto H., Takahashi N., Dutta A.K., Sabirov R.Z., Ando-Akatsuka Y., Morishima S., Okada Y. Ischemia-induced enhancement of CFTR expression on the plasma membrane in neonatal rat ventricular myocytes. *Jpn. J. Physiol.* 2003;53(5):357–365.
15. Jentsch T.J., Pusch M. CLC chloride channels and transporters: Structure, function, physiology, and disease. *Physiol. Rev.* 2018;98(3):1493–1590.
16. Okamoto Y., Nagasawa Y., Obara Y., Ishii K., Takagi D., Ono K. Molecular identification of HSPA8 as an accessory protein of a hyperpolarization-activated chloride channel from rat pulmonary vein cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 2019;294(44):16049–16061.
17. De Jesús-Pérez J.J., Castro-Chong A., Shieh R.C., Hernández-Carballo C.Y. Gating the glutamate gate of CLC-2 chloride channel by pore occupancy. *J. Gen. Physiol.* 2016;147:576–613.
18. Weinreich F., Jentsch T.J. Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J. Biol. Chem.* 2001;276(4):2347–2353.
19. Arreola J., Begenisich T., Melvin J.E. Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons. *J. Physiol.* 2002;541(1):103–112.
20. Palmada M., Dieter M., Boehmer C., Waldegger S., Lang F. Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate CLC-2 channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;321(4):1001–1006.
21. Park K., Begenisich T., Melvin J.E. Protein kinase A activation phosphorylates the rat CLC-2 Cl^- channel but does not change activity. *J. Membr. Biol.* 2001;182(1):31–37.
22. Caputo A., Caci E., Ferrera L., Pedemonte N., Barsanti C., Sondo E., Pfeiffer U., Ravazzolo R., Zegar-Moran O., Galletta L.J.V. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*. 2008;322(5901):590–594.
23. Yannoukakos D., Stuart-Tilley A., Fernandez H.A., Fey P., Duyk G., Alper S.L. Molecular cloning, expression,

and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart. *Circ. Res.* 1994;75(4):603–614.

24. Dang S., Feng S., Tien J., et al. Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Nature*. 2017;552(7685):426–429.

25. Paulino C., Kalienkova V., Lam A.K.M., Neldner Y., Dutzler R. Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM. *Nature*. 2017;552(7685):421–425.

26. Paulino C., Neldner Y., Lam A.K.M., Kalienkova V., Brunner J.D., Schenck S., Dutzler R. Structural basis for anion conduction in the calcium-activated chloride channel TMEM16A. *eLife*. 2017;6:e26232.

27. Hartzell H.C., Yu K., Xiao Q., Chien L.T., Qu Z. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca^{2+} -activated Cl^- channels. *J. Physiol.* 2009;587(Pt. 10):2127–2139.

28. Horváth B., Váczi K., Hegyi B., Gönczi M., Dienes B., Kistamás K., Bányász T., Magyar J. Sarcolemmal Ca^{2+} -entry through L-type Ca^{2+} channels controls the profile of Ca^{2+} -activated Cl^- current in canine ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2016;97:125–139.

29. Sipido K.R., Callewaert G., Carmeliet E. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -dependent chloride current in single Purkinje cells from rabbit heart. *J. Physiol.* 1993;468:641–667.

30. Li G.R., Sun H., To J., Tse H.F., Lau C.P. Demonstration of calcium-activated transient outward chloride current and delayed rectifier potassium currents in Swine atrial myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2004;36(4):495–504.

31. El Chemaly A., Norez C., Magaud C., Bescond J., Chatelier A., Fares N., Findlay I., Jayle C., Becq F., Faivre J.F., Bois P. ANO1 contributes to Angiotensin-II-activated Ca^{2+} -dependent Cl^- current in human atrial fibroblasts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2014;68:12–19.

32. Berg J., Yang H., Jan L.Y. Ca^{2+} -activated Cl^- channels at a glance. *J. Cell Sci.* 2012;125(Pt. 6):1367–1371.

33. Pedemonte N., Galiotta L.J.V. Structure and function of tmem16 proteins (anoctamins). *Physiol. Rev.* 2014;94(2):419–459.

34. Kuruma A., Hartzell H.C. Bimodal control of a Ca^{2+} -activated Cl^- channel by different Ca^{2+} signals. *J. Gen. Physiol.* 2000;115(1):59–80.

35. Yang Y.D., Cho H., Koo J.Y., Tak M.H., Cho Y., Shim W.S., Park S.P., Lee J., Lee B., Kim B.M., Raouf R., Shin Y.K., Oh U. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*. 2008;455(7217):1210–1215.

36. Brunner J.D., Lim N.K., Schenck S., Duerst A., Dutzler R. X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature*. 2014;516(7530):207–212.

37. Schulte G. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol. Rev.* 2010;62(4):632–667.

38. Ma K., Wang H., Yu J., Wei M., Xiao Q. New Insights on the regulation of Ca^{2+} -activated chloride channel TMEM16A. *J. Cell Physiol.* 2017;232(4):707–716.

39. Chun H., Cho H., Choi J., Lee J., Kim S.M., Kim H., Oh U. Protons inhibit anoctamin 1 by competing with calcium. *Cell Calcium*. 2015;58(5):431–441.

40. Ferrera L., Caputo A., Galiotta L.J.V. TMEM16A protein: A new identity for Ca^{2+} -dependent Cl^- channels. *Physiol.* 2010;25(6):357–363.

41. Pifferi S., Dibattista M., Menini A. TMEM16B induces chloride currents activated by calcium in mammalian cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2009;458(6):1023–1038.

42. Jung J., Nam J.H., Park H.W., Oh U., Yoon J.H., Lee M.G. Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO_3^- permeability by Ca^{2+} /calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110(1):360–365.

43. Vocke K., Dauner K., Hahn A., Ulbrich A., Broecker J., Keller S., Frings S., Möhrle F. Calmodulin-dependent activation and inactivation of anoctamin calcium-gated chloride channels. *J. Gen. Physiol.* 2013;142(4):381–404.

44. Cipriani G., Serboiu C.S., Gherghiceanu M., Simonetta Fausone-Pellegrini M., Vannucchi M.G. NK receptors, Substance P, Anol1 expression and ultrastructural features of the muscle coat in Cav-1^{-/-} mouse ileum. *J. Cell Mol. Med.* 2011;15(11):2411–2420.

45. Pritchard H., Leblanc N., Albert A.P., Greenwood I.A. Inhibitory role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channels in rat pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* 2014;171(18):4311–4321.

46. Bulley S., Neeb Z.P., Burris S.K., Bannister J.P., Thomas-Gatewood C.M., Jangsangthong W., Jaggar J.H. TMEM16A/ANO1 channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries. *Circ. Res.* 2012;111(8):1027–1036.

47. Balderas E., Ateaga-Tlecuitl R., Rivera M., Gomora J.C., Darszon A. Niflumic acid blocks native and recombinant T-type channels. *J. Cell Physiol.* 2012;227(6):2542–2555.

48. De La Fuente R., Namkung W., Mills A., Verkman A.S. Small-molecule screen identifies inhibitors of a human intestinal calcium-activated chloride channel. *Mol. Pharmacol.* 2008;73(3):758–768.

49. Huang F., Zhang H., Wu M., et al. Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012;109(40):16354–16359.

50. Oh S.J., Hwang S.J., Jung J., Yu K., Kim J., Choi J.Y., Hartzell H.C., Roh E.J., Lee C.J. MONNA, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1. *Mol. Pharmacol.* 2013;84(5):726–735.

51. Ghouli M.R., Fiocco T.A., Binder D.K. Structure-function relationships of the LRRC8 subunits and subdomains of the volume-regulated anion channel (VRAC). *Front. Cell Neurosci.* 2022;16:962714.

52. Lutter D., Ullrich F., Lueck J.C., Kempa S., Jentsch T.J. Selective transport of neurotransmitters and modulators by distinct volume-regulated LRRC8 anion channels. *J. Cell Sci.* 2017;130(6):1122–1133.

53. Jentsch T.J. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016;17(5):293–307.

54. Deneka D., Sawicka M., Lam A.K.M., Paulino C., Dutzler R. Structure of a volume-regulated anion channel of the LRRC8 family. *Nature*. 2018;558(7709):254–259.

55. Kasuya G., Nakane T., Yokoyama T., Jia Y., Inoue M., Watanabe K., Nakamura R., Nishizawa T., Kusakizako T., Tsutsumi A., Yanagisawa H., Dohmae N., Hattori M., Ichijo H., Yan Z., Kikkawa M., Shirouzu M., Ishitani R., Nureki O. Cryo-EM structures of the human volume-regulated anion channel LRRC8. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018;25(9):797–804.

56. Qiu Z., Dubin A.E., Mathur J., Tu B., Reddy K., Miraglia L.J., Reinhardt J., Orth A.P., Patapoutian A. SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell*. 2014;157(2):447–458.

57. Voss F.K., Ullrich F., Munch J., Lazarow K., Lutte D., Mah N., Andrade-Navarro M.A., von Kries J.P., Stauber T., Jentsch T.J. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science*. 2014;344(6184):634–638.
58. Okada T., Islam M.R., Tsiferova N.A., Okada Y., Sapiro R.Z. Specific and essential but not sufficient roles of LRRC8A in the activity of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR). *Channels*. 2017;11(2):109–120.
59. Pervaiz S., Kopp A., von Kleist L., Stauber T. Absolute protein amounts and relative abundance of volume-regulated anion channel (VRAC) LRRC8 subunits in cells and tissues revealed by quantitative immunoblotting. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(23):5879.
60. Egorov Y.V., Lang D., Tyan L., Turner D., Lim E., Piro Z.D., Hernandez J.J., Lodin R., Wang R., Schmuck E.G., Raval A.N., Ralphe C.J., Kamp T.J., Rosenshtraukh L.V., Glukhov A.V. Caveolae-mediated activation of mechanosensitive chloride channels in pulmonary veins triggers atrial arrhythmogenesis. *J. Am. Heart Assoc.* 2019;8(20):e012748.
61. Centeio R., Ousingsawat J., Schreiber R., Kunzelmann K. Ca^{2+} dependence of volume-regulated VRAC/LRRC8 and TMEM16A Cl^- channels. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:596879.
62. Liu Y., Zhang H., Men H., Du Y., Xiao Z., Zhang F., Huang D., Du X., Gamper N., Zhang H. Volume-regulated Cl^- current: Contributions of distinct Cl^- channels and localized Ca^{2+} signals. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2019;317(3):C466–C480.
63. Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V., Droogmans G. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1997;68(1):69–119.
64. Rudkouskaya A., Chernoguz A., Haskew-Layton R.E., Mongin A.A. Two conventional protein kinase C isoforms, α and β I, are involved in the ATP-induced activation of volume-regulated anion channel and glutamate release in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 2008;105(6):2260–2270.
65. Fisher S.K., Cheema T.A., Foster D.J., Heacock A.M. Volume-dependent osmolyte efflux from neural tissues: Regulation by G-protein-coupled receptors. *J. Neurochem.* 2008;106(5):1998–2014.
66. Nilius B., Voets T., Prenen J., Barth H., Aktories K., Kaibuchi K., Droogmans G., Eggermont J. Role of Rho and Rho kinase in the activation of volume-regulated anion channels in bovine endothelial cells. *J. Physiol.* 1999;516(Pt. 1):67–74.
67. Modi A.D., Khan A.N., Cheng W.Y.E., Modi D.M. KCCs, NKCCs, and NCC: Potential targets for cardiovascular therapeutics? A comprehensive review of cell and region specific expression and function. *Acta Histochem.* 2023;125(4):152045.
68. Wang H.S. Critical role of bicarbonate and bicarbonate transporters in cardiac function. *World J. Biol. Chem.* 2014;5(3):334.
69. Meor Azlan N.F., Zhang J. Role of the cation-chloride-cotransporters in cardiovascular disease. *Cells*. 2020;9(10):2293.
70. Hartmann A.M., Nothwang H.G. Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters. *Front. Cell Neurosci.* 2015;8:470.
71. Nan J., Yuan Y., Yang X., Shan Z., Liu H., Wei F., Zhang W., Zhang Y. Cryo-EM structure of the human sodium-chloride cotransporter NCC. *Sci. Adv.* 2022;8(45):eadd7176.
73. Lang F., Voelkl J. Therapeutic potential of serum and glucocorticoid inducible kinase inhibition. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2013;22(6):701–714.
74. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1996;270(5 Pt. 1):C1388–C1397.
75. Smith J.B., Smith L. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in cultured vascular smooth muscle cells: Stimulation by angiotensin II and calcium ionophores, inhibition by cyclic AMP and calmodulin antagonists. *J. Membr. Biol.* 1987;99(1):51–63.
76. Adragna N.C., White R.E., Orlov S.N., Lauf P.K. K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: Possible implication in vasodilation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000;278(2):C381–C390.
77. Kahle K.T., Rinehart J., Ring A., Gimenez I., Gamba G., Hebert S.C., Lifton R.P. WNK protein kinases modulate cellular Cl^- flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:326–335.
78. Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Dulin N.O., Gusakova S.V. Cation-chloride cotransporters: Regulation, physiological significance, and role in pathogenesis of arterial hypertension. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014;79(13):1546–1561.
79. Mount D.B., Mercado A., Song L., Xu J., George A.L., Jr., Delpire E., Gamba G. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J. Biol. Chem.* 1999;274(23):16355–16362.
80. Lytle C., McManus T. Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002;283(5):C1422–C1431.
81. Delpire E. Advances in the development of novel compounds targeting cation-chloride cotransporter physiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2021;320(3):C324–C340.
82. Gagnon M., Bergeron M.J., Lavertu G., et al. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat. Med.* 2013;19(11):1524–1528.
83. Garneau A.P., Marcoux A.A., Slimani S., Tremblay L.E., Frenette-Cotton R., Mac-Way F., Isenring P. Physiological roles and molecular mechanisms of $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport in the mammalian kidney and cardiovascular system: where are we? *J. Physiol.* 2019;597(6):1451–1465.
84. Uhlen M., Uhlén M., Fagerberg L., et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
85. Karlsson M., Zhang C., Méar L., et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci. Adv.* 2021;7(31):eabn2169.
86. Litviňuková M., Talavera-López C., Maatz H., et al. Cells of the adult human heart. *Nature*. 2020;588(7838):466–472.
87. Ludwig A., Rivera C., Uvarov P. A noninvasive optical approach for assessing chloride extrusion activity of the K-Cl cotransporter KCC2 in neuronal cells. *BMC Neurosci.* 2017;18(1):23.
88. Garneau A.P., Marcoux A.A., Noël M., Frenette-Cotton R., Drolet M.C., Couet J., Larivière R., Isenring P. Ablation of potassium-chloride cotransporter type 3 (Kcc3) in mouse causes multiple cardiovascular defects and isosmotic polyuria. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154398.

89. Alvarez B.V., Kieller D.M., Quon A.L., Markovich D., Casey J.R. Slc26a6: A cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. *J. Physiol.* 2004;561(Pt. 3):721–734.

90. Bonar P.T., Casey J.R. Plasma membrane $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers: Structure, mechanism and physiology. *Channels.* 2008;2(5):337–345.

91. Kudrycki K.E., Newman P.R., Shull G.E. cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger. *J. Biol. Chem.* 1990;265(1):462–471.

92. Alvarez B.V., Kieller D.M., Quon A.L., Robertson M., Casey J.R. Cardiac hypertrophy in anion exchanger 1-null mutant mice with severe hemolytic anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;292(3):H1301–H1312.

93. Lohi H., Lamprecht G., Markovich D., Heil A., Kujala M., Seidler U., Kere J. Isoforms of SLC26A6 mediate ani-

on transport and have functional PDZ interaction domains. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003;284(3): C769–C779.

94. Chernova M.N., Jiang L., Friedman D.J., Darman R.B., Lohi H., Kere J., Vandorpe D.H., Alper S.L. Functional comparison of mouse slc26a6 anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: Differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity. *J. Biol. Chem.* 2005;280(9):8564–8580.

95. Cingolani H.E., Chiappe G.E., Ennis I.L., Morgan P.G., Alvarez B.V., Casey J.R., Dulce R.A., Pérez N.G., Camilión de Hurtado M.C. Influence of Na^+ -Independent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange on the slow force response to myocardial stretch. *Circ. Res.* 2003;93(11):1082–1088.

Поступила в редакцию 10.07.2024

После доработки 31.07.2024

Принята в печать 02.08.2024

REVIEW

Structural basis and molecular mechanisms of Cl^- transmembrane transport in cardiomyocytes

Y.A. Voronina^{1, 2, *} , A.M. Karhov^{1, 2} , V.S. Kuzmin^{1, 2} 

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Academician Smirnov Institute of Experimental Cardiology, Academician Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, st. Academician Chazova, 15a, Moscow, 121552, Russia

*e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru

The intracellular concentration of chlorine anions ($[\text{Cl}^-]_i$), the equilibrium potential for chlorine anions (E_{Cl}) and transmembrane chloride currents (I_{Cl}) are the factors that significantly influence the electrophysiological properties of excitable tissue, including the myocardium. Several types of chloride (anion) conductance have been identified in the heart. In recent years, a number of transmembrane proteins demonstrating chloride conductance have been identified (CFTR, CIC, TMEM16, LRRC8), and the expression of these macromolecules in cardiac tissue has been confirmed. Accumulated data allow for establishing a molecular substrate for some chloride anion currents ($I_{\text{Cl,PKA}}$, $I_{\text{Cl,ir}}$, $I_{\text{Cl,vol}}$, $I_{\text{Cl,swell}}$, $I_{\text{Cl,Ca}}$, I_{to2}) detected in the heart. Furthermore, the molecular mechanisms regulating $[\text{Cl}^-]_i$ and E_{Cl} through chloride cotransporters (KCC, NKCC1) and chloride-bicarbonate exchangers have been established. The variety of structures determining chloride transmembrane conductivity and the complexity of molecular mechanisms regulating chloride homeostasis underlie the complex effects of activation of chloride transporters in the pacemaker, conduction system and working myocardium of the heart. This review discusses the structural, biophysical properties and molecular regulation of chloride transporter protein complexes identified in the myocardium. The review also covers the mechanisms by which chloride transmembrane transport influences the bioelectrical activity of cardiomyocytes.

Keywords: chloride channels, cation-chloride cotransporters, chloride-bicarbonate exchanger, chloride transport, chloride current, cardiac electrophysiology

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-15-00189.

Сведения об авторах

Воронина Яна Алексеевна — ассистент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6624-7805>

Кархов Андрей Михайлович — студент магистратуры кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: akarchoff@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0919-0712>

Кузьмин Владислав Стефанович — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ku290381@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3075-4834>

ОБЗОР

УДК 612.8+57.024



Сложные «простые нервные системы»

Д.Ю. Афанасьева, П.М. Балабан* 

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Российская академия наук,
Россия, 117485, г. Москва, Бутлерова, д. 5а

*e-mail: pmbalaban@gmail.com

Наземные брюхоногие моллюски развили новые структуры в нервной системе по сравнению с морскими и водными улитками, чтобы адаптироваться к новой среде обитания. Поведение этих животных качественно отличается от поведения водных брюхоногих моллюсков и включает в себя не только возможность активного взаимодействия с другими животными, но и демонстрацию интереса активным приближением, избегание или бегство в определенных случаях. Феномен «стрелы любви», используемый при оплодотворении, уникален для Природы. У этих животных можно сформировать практически все виды ассоциативной памяти, продемонстрировать консолидацию и реконсолидацию памяти, проанализировать механизмы поддержания и модификации памяти. На уровне функционально идентифицированных нейронов и нейронных кластеров возможно исследовать ассоциативные процессы *in vitro*, разработана 3-нейронная модель ассоциативных долговременных изменений синаптической эффективности.

Ключевые слова: нейрон, синаптическая пластичность, беспозвоночные, поведение, память, реконсолидация

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-5

Введение

Фундаментальные сравнительно-физиологические исследования механизмов пластичности нервной системы стали традиционными для кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ благодаря Х.С. Коштоянцу и целой плеяды его учеников. В том числе работы Д.А. Сахарова и его учеников на самых разных видах моллюсков были пионерскими во многих аспектах, а особенно выделяется гипотеза полигенеза медиаторов, рассматривающая причины медиаторного разнообразия и его эволюционные варианты [1]. Исследования нашей группы в области механизмов высших функций мозга и нейрофизиологии поведения животных всегда проходили в тесном контакте с лабораторией Д.А. Сахарова и под влиянием разработанных им представлений.

Задача, поставленная перед нами в 70-е гг., заключалась в поиске минимально простой нейронной сети, лежащей в основе «простого» поведения, и внутриклеточном анализе принципов организации синаптических связей в этой сети. Первой моделью послужил плевральный ганглий большого прудовика, в котором было несколько сотен нейронов и была надежда, что, записав активность этих нейронов, мы сможем узнать что-то новое. После полутора лет работы оказалось, что этот ганглий содержит в основном сенсорные

нейроны и напрямую не связан ни с какой формой поведения. Без долгих раздумий наша группа перешла к нервной системе вторично-наземного легочного моллюска *Helix lucorum* L. со значительно более сложным поведением и нервной системой из десятков тысяч нейронов. Причем в этот раз мы начали именно с регистрации максимально возможных проявлений поведения на специально разработанном препарате с полным сохранением всех нервов от центральной нервной системы (ЦНС) к периферии и регистрацией движений органов. Именно подход от поведения и двигательной активности животного оказался продуктивным и позволил проанализировать нейронные механизмы простых форм поведения и даже подойти к проблеме механизмов ассоциативной памяти.

Обучение и память у брюхоногих моллюсков

Обучение и память — основной механизм долговременной адаптации организма к окружающей среде. Брюхоногие улитки обладают многими свойствами, облегчающими анализ поведения из-за относительно стереотипного поведения и небольшого количества нейронов в нервной системе. Брюхоногие моллюски являются наиболее разнообразным классом в типе моллюсков. Анатомия, поведение, пищевые и репродуктивные

приспособления брюхоногих моллюсков значительно различаются от одного семейства к другому. Подробный анализ многих используемых в поведенческих исследованиях брюхоногих моллюсков можно найти в книге Р. Чейза [2]. Наиболее используемые в нейробиологии виды *Aplysia* и *Lymnaea stagnalis* являются водными животными с довольно ограниченным поведением. Наземные брюхоногие моллюски, дышащие воздухом (Pulmonata, Stylommatophora), вторично адаптировались к жизни на суше и развили новые формы поведения, поддерживаемые новыми для мозга улитки нейронными структурами. Например, у наземного брюхоногого моллюска — *Helix lucorum* (виноградной улитки), количество нейронов, участвующих только в обонянии, составляет около 80 000, в то время, как в остальной нервной системе всего только около 20 000 [3]. Соответствующие области мозга отсутствуют у водных улиток из-за малой роли обоняния у этих животных. У виноградной улитки хорошо видны мантия и дыхательное отверстие (пневмостом), у нее есть две пары втягивающихся щупалец с сенсорными областями на конце каждого щупальца и глазами на кончике больших щупалец (омматофоры). Первое большое исследование дыхания виноградной улитки опубликовано в 1803 г., убедительно показано наличие легкого, акты вдоха и выдоха [4]. Наземные слизни, у которых не осталось внешней раковины (как у слизней *Arion* и *Limax*), также обладают большой обонятельной областью в церебральных ганглиях, и только в этой части нервной системы может быть зарегистрирована спонтанная ритмическая активность в мозге улитки, аналогичная мозговым волнам у млекопитающих [5]. В настоящей главе мы сосредоточимся на наземных улитках и будем использовать виды *Helix* в качестве примера.

Поведенческий репертуар *Helix*

В поведении наземных улиток (Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora) можно обнаружить все основные формы, характерные для высших позвоночных, включая человека. Это пищевое поведение, отдергивание (избегание), исследовательское и половое поведение. Мы кратко опишем все эти формы поведения, используя *Helix* в качестве примера.

Развитие наземных улиток происходит почти исключительно внутри яйца около 3 недель. Полноценные молодые улитки похожи на взрослых, но с меньшим количеством нейронов и значительными различиями в поведении. Было показано, что в первые недели после вылупления ювенильные улитки имеют минимальное количество серотонина в своей нервной системе, несмотря на существование серотонинергических нейронов, и не демонстрируют усиления реакций избегания, характерных для поведения взрослых улиток [3, 6].

Пищевое поведение

Все виды *Helix* (*H. lucorum*, *H. aspersa* и др.) являются универсальными травоядными. Голодные улитки улавливают запахи пищи с расстояния 20–50 см с помощью обонятельных рецепторных областей, расположенных на кончиках каждого из их четырех щупалец. В присутствии пищи *Helix* выворачивает губы, на которых находится большое количество хеморецепторов, и касается потенциальной пищи маленькими щупальцами (ринофорами). В пищевом поведении улиток легко различимы аппетитивная и консумматорная фаза. Аппетитивная фаза включает активное перемещение в направлении пищи. Завершающая фаза состоит из поднятия головы, касания пищи губами и начала ритмичных движений глоточных мышц, приводящих к соскабливанию пищи хитиновыми радулами, которые имеют до 3 тыс. микроскопических зубов. Окончательное решение о начале «жевания» основывается на хемосенсорной информации, полученной от хеморецепторов губ. В случае неприятных запахов улитка втягивает щупальца и прекращает движение, затем меняет направление движения. Разница между положительной и отрицательной реакцией на пищу качественная — приближение в случае положительной реакции и избегание в случае отрицательной реакции. В следующих разделах будет описана способность *Helix* ассоциировать запах пищи с последующим ударом электрического тока и изменения поведения на альтернативное.

Оборонительное поведение

В ответ на опасные раздражители (тактильные, химические, тепловые, вибрационные, выключение света) наземные улитки демонстрируют реакции отдергивания щупалец, которые можно рассматривать как компоненты поведения пассивного избегания, сопровождающиеся выделением слизи из мантийного валика в случае очень сильных раздражителей. Можно выделить три типа реакции на тактильную стимуляцию кожи. Первый тип — это локальные сокращения кожи и мышц в месте стимуляции в ответ на слабые (давление 5–6 г/мм²) раздражители. Эта реакция не опосредована ЦНС и может наблюдаться у животных с удаленными центральными ганглиями. Латентность этого локального ответа, опосредованного периферическими нейронами, составляет около 0,1 с. Второй тип реакции — это поведенческая реакция на тактильные раздражители умеренной интенсивности (15–40 г/мм²), которая исчезает после удаления ЦНС. Эта реакция включает закрытие пневмостома (отверстие легочной полости), сокращение щупалец и втягивание головы независимо от места стимуляции. Латентность составляет около 0,2 с. На этой стадии тело улитки не втягивается в раковину, но передвижение прекращается. Третий тип поведенческой

реакции на сильные опасные раздражители любой модальности включает в себя все предыдущие реакции и генерализованную реакцию пассивного избегания: втягивание всего тела в панцирь из-за сокращения колумеллярных мышц, сопровождающееся защитной реакцией выделения слизи из мантийного валика. Активное поведение избегания (бегство) у наземных улиток можно наблюдать только в тех случаях, когда стимулы слабой или умеренной интенсивности применяются многократно, в течение нескольких минут, но не вызывают генерализованной оборонительной реакции. Чтобы избежать такой стимуляции, животное активно уходит.

Исследовательское поведение

Трудно провести различие между аппетитивной фазой кормления, во время которой улитка активно передвигается, и исследовательской локомоцией. Во время всех видов двигательной активности даже сытые улитки контактируют с субстратом губами и ринофорами, иногда пытаясь проглотить его, совершая скребущие движения радулой. Следует отметить, что насытившиеся улитки обычно не двигаются, а остаются неподвижными в раковинах. Интересный случай исследовательского поведения можно легко увидеть в ответ на слабую повторяющуюся тактильную стимуляцию. Вместо того, чтобы отстраниться, улитка поворачивает голову к стимулируемому месту и пытается активно связаться со стимулирующим объектом и исследовать его. Высокая влажность и уровень воды вызывают высокий уровень двигательной активности даже у сытых улиток, что можно рассматривать как исследовательскую активность, по крайней мере, частично. Иногда улитки в таких условиях преодолевают довольно большое расстояние. Важной частью исследовательского поведения является периодическое поднятие головной части тела во время активного передвижения и поворачивание щупалец в левую и правую стороны (rearing), таким образом улитка исследует окружающую среду.

Половое поведение

Половое поведение *Helix* уникально в природе. Легочные улитки — исключительно гермафродиты с полным набором репродуктивных органов обоих полов, размножение только путем перекрестного оплодотворения. Большинство легочных наземных улиток, дышащих воздухом, демонстрируют стереотипное тактильное поведение ухаживания перед совокуплением. Ухаживание у этих гермафродитных улиток длится около 8 ч и состоит из 12 различных стадий [2]. Несколько семейств этой группы (*Stylommatophora*) содержат виды улиток и слизней, которые создают в специальном органе известковые или хитиновые «стрелы любви» длиной до 8 мм. Кульминацией ухаживания является

выстреливание «стрелы любви» в партнера. Стрела содержит гормоноподобные пептиды, которые способствуют выживанию сперматозоидов и изменению поведения реципиента [7]. Через короткое время пенис выворачивается и начинается совокупление, которое продолжается около 6 ч. Группа нейронов в метациральной доле мозгового ганглия была идентифицирована Р. Чейзом [8] как ответственная за высвобождение «стрелы любви» и выворачивание полового члена, ингибирование активности нейронов, участвующих в оборонительном поведении [9]. Обычно в поведенческой иерархии *Helix* оборонительное поведение подавляет пищевое поведение и исследовательскую локомоцию, но было показано [7], что начало полового поведения может подавлять пищевое поведение и локомоцию во время спаривания, однако оборонительные реакции подавляются незначительно, и сильные опасные стимулы могут остановить спаривание.

Функциональная структура нервной системы наземных улиток

Анализ нейронных механизмов долгосрочных изменений в поведении требует знания лежащих в основе нейронных сетей и синаптических связей вовлеченных нейронов. Поведенческая нейробиология беспозвоночных началась с функционального описания отдельных нейронов, способных вызывать поведенческий акт [10]. У наземных брюхоногих моллюсков морфологически и функционально были идентифицированы четыре функциональных класса идентифицируемых нервных клеток, участвующих в оборонительном поведении, которое обычно использовалось для поведенческих экспериментов по обучению и запоминанию [11].

Первичные механосенсорные клетки

В плевроальном и париетальном ганглиях *Helix* были идентифицированы небольшие (10–40 мкм) клетки, реагирующие на тактильную стимуляцию определенного небольшого участка кожи улитки коротко-латентными импульсами. Без стимуляции эти клетки молчали, но реагировали длительной гиперполяризацией на стимуляцию всех других областей. Спайковые разряды в ответ на тактильные стимулы зависели от местоположения и интенсивности стимула и вызывались даже стимулами, которые были подпороговыми для поведенческих реакций [12]. Внутриклеточная стимуляция одной такой клетки никогда не вызывала никакой поведенческой реакции. Было обнаружено, что почти все эти клетки (около 30 в каждом ганглии) моносинаптически связаны со всеми девятью премоторными (командными) интернейронами, участвующими в запуске оборонительного поведения. Было показано, что нейриты этих сенсорных клеток выходят на периферию.

Двигательные (мото)нейроны

Нейроны, посылающие свои нейриты к периферическим органам, были обнаружены путем ретроградного окрашивания во всех ганглиях наземных улиток. Помимо ранее описанных первично-сенсорных клеток, были обнаружены спонтанно активные нейроны. В изолированной ЦНС эти клетки обычно ритмически активны, в то время, как в препаратах с интактными эффекторами — наблюдается сильная синаптическая модуляция. Спонтанная залповая активность коррелирует со спонтанными движениями эффекторов, иннервируемых этими клетками. Эти клетки посылают нейрит (аксон) к определенному эффектору и синаптически реагируют на все внешние раздражители, вызывающие поведенческие реакции отдергивания с участием этого эффектора изменением частоты спонтанной активности. Внутриклеточная стимуляция одного из моторных нейронов обычно не вызывает целенаправленной поведенческой реакции, но сокращения части мышц можно наблюдать во время сильной активации. Синаптической или электрической связи между этими клетками у *Helix* отмечено не было. Свойства моторных нейронов предполагают их функционирование как группы клеток с полимодальным сенсорным входом и функционально общим выходом.

Модулирующие нейроны

В нервной системе *Helix* легко идентифицируются несколько скоплений серотонинергических клеток [13]. Серотонинергическая гигантская клетка номер один (CG1), расположенная на вентральной поверхности церебральных ганглиев и участвующая в контроле пищевого поведения, идентифицируется у всех брюхоногих моллюсков, так же, как и группа из 10–15 очень маленьких серотонинергических клеток рядом с этим нейроном. Было обнаружено, что CG1 моносинаптически контролирует моторные нейроны буккальных ганглиев, участвующие в пищевом поведении. Кроме того, было показано, что группа из 100–150 серотонинергических клеток в ростральной части педальных ганглиев способна модулировать синаптический вход премоторных интернейронов, участвующих в сети, лежащей в основе оборонительного поведения. Внутриклеточная активация этих клеток не вызывала немедленных поведенческих эффектов, но изменяла (модулировала) амплитуды поведенческих реакций на опасные внешние раздражители в течение многих минут. Частота спонтанной активности в этих нейронах зависела от уровня насыщения животного. Опасные стимулы (тактильные, химические, ноцицептивные) вызвали активацию серотонинергических педальных нейронов. Серотонинергические клетки, расположенные в ростральной части педальных ганглиев, электрически связаны с соседями по группе со средним коэффициентом связи около 0,1, таким образом, привле-

кая множество клеток из группы, когда одна из них была активирована полимодальными сенсорными входами или внутриклеточной стимуляцией одной из клеток [14, 15].

Премоторные интернейроны оборонительного поведения = командные нейроны

Было показано, что внутриклеточная активация девяти идентифицируемых гигантских нейронов в париетальных и плевральных ганглиях запускает реакцию отмены у наземных улиток [11]. Активность пяти гигантских нейронов париетальных ганглиев вызывала сокращение основной мышцы, соединяющей тело и раковину, сокращение мантийного валика, закрытие отверстия легочной полости. Активность четырех гигантских нейронов плевральных ганглиев вызывала сокращение мышц щупалец и втягивание головы.

Следующие особенности оборонительных интернейронов позволяют рассматривать их как **командные нейроны**: (1) внутриклеточно вызванная активность с частотой 3 Гц и более вызывала скоординированные оборонительные поведенческие реакции, специфичные для каждой клетки; (2) ответы на опасную стимуляцию различных модальностей всегда предшествовали или совпадали с оборонительными реакциями; (3) первично-сенсорные механорецептивные нейроны моносинаптически связаны с этими клетками; (4) спонтанные разряды в этих нейронах не коррелировали с движениями эффекторов, не вызванными внешними раздражителями (например, закрытием пневмостома); (5) механорецептивные, хеморецептивные, фоторецептивные и терморецептивные пути (полимодальный сенсорный вход) конвергируют на этих клетках; (6) внутриклеточная активация этих клеток активирует мотонейроны; (7) внутриклеточная гиперполяризация одной из этих клеток устраняет из оборонительного поведения компонент, аналогичный компоненту, вызываемому внутриклеточной активацией той же клетки [14]. Все эти девять идентифицированных интернейронов содержат нейротрансмиттер FMRFa, который функционально действует реципрокно серотонину, и могут быть функционально описаны как премоторные клетки, которые способны запускать компоненты (командовать компонентами) оборонительного поведения на основе конвергентного полимодального синаптического входа. Нейроны из этой функциональной группы можно назвать командными клетками в соответствии с определением [16, 17], поскольку они необходимы и достаточны для запуска координированных поведенческих актов.

Структура нейронной сети, лежащей в основе оборонительного и пищевого поведения

В попытке описать у улитки нейронные сети, лежащие в основе пищевого и оборонительного поведения, которые активировались при ассоциативном обучении улитки (запах пищи + удар элек-

трическим током), можно очертить простейшую цепочку сенсорно-премоторных нейронов с несинаптическим управлением от модулирующих интернейронов. Схема синаптических взаимосвязей и специфичности нейромедиаторов, основанная на внутриклеточной записи от идентифицируемых нейронов и кластеров нейронов, иммунохимическом анализе, показана на рисунке.

Помимо входов от премоторных (командных) клеток, мотонейроны получают синаптическую информацию непосредственно от сенсорных клеток, поскольку латентность синаптической реакции на опасные стимулы в моторных и интернейронах одинакова. Возможно вызвать компоненты оборонительных реакций без участия интернейронов (командных клеток), и их вклад в основном необходим для быстрого и эффективного запуска оборонительных реакций опасными стимулами. Пищевое поведение может быть вызвано повышением концентрации дофамина во внеклеточном растворе (гемолимфе). Важно отметить, что модулирующие серотонинергические клетки высвобождают передатчик в основном несинаптически, из варикозных расширений, таким образом влияя на большую площадь нейропиля, многие нейроны [13, 14, 18, 19]. Педальный серотонинергический кластер представляет собой функциональную группу нейронов, модулирующих сеть оборонительного поведения улитки.

Механизмы формирования, поддержания и модификации памяти у наземных улиток

Поведенческая пластичность и ассоциативная память у наземных улиток

Две простейшие формы поведенческой пластичности — привыкание (негативное обучение) и сенсibilизация (фасилитация, дегабитуация и т.д.) — обычно рассматриваются, как неассоциативные формы пластичности, поскольку они

возникают без ассоциации двух стимулов, представленных экспериментатором. В реальности поведенческих экспериментов, если вы предъявляете один стимул, он неизбежно ассоциируется с контекстом, в котором он был предъявлен. Таким образом, предъявление любого стимула связано с контекстом, и если эта ассоциация проходит стадию консолидации (4–6 ч), то воспоминание следует рассматривать как ассоциативную долговременную память. К сожалению, в литературе существует негласное правило считать изменения в поведении, вызванные предъявлением только одного стимула, неассоциативными. Примером может служить хорошо изученный феномен долговременной сенситизации (Long-Term Sensitization, LTS) у морского моллюска аплизии, который рассматривается в статьях как неассоциативный [20], несмотря на тот факт, что в этой же лаборатории было показано, что сенситизация ассоциативно зависит от контекста, если тестировать через десятки часов [21]. В этих экспериментах животные демонстрировали память (усиленные реакции отдергивания) только в том случае, когда их били током.

В павловских традициях все долговременные (дни, недели) воспоминания считаются ассоциативными. Все виды памяти зависят от контекста, в котором они были сформированы, и сенсорные сигналы являются частью контекста, который можно использовать отдельно для детального анализа механизмов памяти. У наземных брюхоногих моллюсков были продемонстрированы положительные и отрицательные воспоминания о запахах пищи, обусловленные отвращением к контексту (окружающей среде), все виды обусловливания [23], самостимуляция свободно ведущих себя улиток электродами, имплантированными в мезоцеребральные клетки, участвующие в половом акте, поведение [24], и даже феномен реконсолидации долговременной памяти [25].

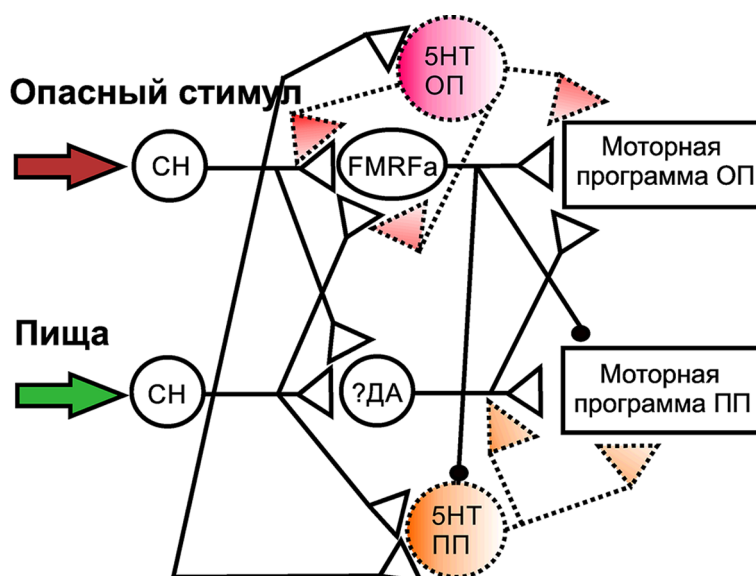


Рисунок. Схема нейронных сетей оборонительного и пищевого поведения.

Самостимуляция и реконсолидация у наземных улиток

Эксперименты, демонстрирующие возможность самостимуляции, были проведены на свободно передвигающихся улитках с электродами, хронически имплантированными в мезоцеребральную область, где расположены клетки, участвующие в половом поведении. Животное было зафиксировано за раковину таким образом, чтобы оно могло двигаться с любой скоростью по плавающему в воде мячу, но при этом оставалось на одном и том же месте, и можно было расположить на расстоянии 5–7 мм от головы рычаг, который замыкал цепь локальной внутримозговой стимуляции. Идея эксперимента состояла в том, чтобы найти условия, при которых улитка будет стремиться увеличивать или уменьшать частоту нажатия на рычаг, показывая таким образом, что им «нравится» или «не нравится» активация определенной группы нейронов. В случае электрической стимуляции мозга такие «симпатии» не обусловлены голодом или какой-либо физиологической потребностью, и результаты можно интерпретировать как наличие у беспозвоночных процессов, подобных эмоциям. Результаты ясно показали, что в случае стимуляции нейронов, содержащих энкефалины, животные значительно увеличивали частоту нажатия на рычаг, в то время как при стимуляции премоторных нейронов, содержащих FMRFa и участвующих в оборонительном поведении, животные почти полностью переставали прикасаться к рычагу [24, 26]. Эти результаты свидетельствуют о существовании в нервной системе беспозвоночных процессов, подобных эмоциям.

Реконсолидация представляет собой уникальное явление лабилизации и обновленной консолидации существующей долговременной памяти, вызванное напоминанием. Контекстно-зависимая долговременная память была продемонстрирована у морских и пресноводных моллюсков [21]. У наземных улиток ассоциативная контекстуальная память была подробно описана ранее [13, 14, 27] и было продемонстрировано, что блокатор синтеза белка анизомицин ухудшает контекстуальную память, если его вводить сразу после реактивации памяти, что предполагает существование фазы реконсолидации для поддержания памяти [25].

Одна серотонинергическая (модулирующая) клетка может опосредовать ассоциативный процесс долговременной сенситизации синаптических входов

Три функционально различные группы серотонинергических нейронов были описаны в *Helix* [28]. Показано, что церебральная группа серотонинергических клеток модулирует пищевое поведение и моносинаптически контролирует моторные нейроны буккальных ганглиев, управляющих пищевым поведением [27]. Группа серотонинергических клеток, расположенных на границе правого париетального и висцерального ганглиев,

предположительно участвует в контроле деятельности сердца и желудочно-кишечного тракта, хотя их точная функция до сих пор неизвестна. Серотонинергические клетки pedalных ганглиев участвуют в модуляции оборонительного поведения [19] и возможном контроле локомоции, о чем свидетельствует их схема ветвления.

Было показано, что только одна серотонинергическая клетка из группы, расположенной в роstralной части pedalных ганглиев (клетка Pd4), посылает свои отростки в нейропиль париетальных ганглиев, где расположены синапсы между сенсорными и премоторными нейронами [13]. Иммунохимическое исследование показало наличие серотонинергических окончаний в нейропиле и в окружении тел премоторных интернейронов париетальных ганглиев, что указывает на возможность прямых взаимодействий между серотонинергическими нейронами и интернейронами [18]. В модельной ситуации, когда синаптические входы в премоторные интернейроны совпадали или явно не совпадали во времени с внутриклеточной активацией модулирующих клеток, было показано, что внеклеточная активация группы роstralных серотонинергических клеток может служить подкреплением для ассоциативных изменений в синаптических контактах. В этих экспериментах было показано, что в простейшей системе из трех нейронов эффективность синапса между сенсорной клеткой и интернейроном может изменяться в течение нескольких часов путем совпадения во времени моносинаптического входа и внутриклеточно индуцированной активности в одном серотонинергическом модулирующем нейроне [13]. Было показано, что внутриклеточной активации одной идентифицированной серотонинергической клетки достаточно для формирования ассоциативных изменений в моносинаптических связях посредством увеличения $[Ca^{2+}]$ в постсинаптической клетке [29] в простой сети, состоящей всего из трех нейронов: сенсорного, премоторного интернейрона и модулирующей серотонинергической клетки.

У различных беспозвоночных было показано участие отдельных модулирующих клеток в модификациях поведения. Внутриклеточная стимуляция идентифицируемых церебральных нейронов СВ1 аплии способствовала повышению эффективности синапса между сенсорными нейронами и моторными нейронами, подтверждая участие отдельных серотонинергических клеток в пресинаптическом облегчении [30]. Сообщалось о нескольких примерах идентифицированных модуляторных интернейронов, участвующих в пластических долговременных изменениях. Было показано, что идентифицированный октопаминергический нейрон может опосредовать подкрепление у медоносных пчел во время обонятельного обусловливания. Этот нейрон реаги-

рует на сахарозу (вознаграждение) длительным возбуждением, и его деполяризация заменяет вознаграждение при однократном сочетании [31].

Можно сделать вывод, что возможность для одного модулирующего нейрона служить основой подкрепления для длительных пластических изменений синаптических связей существует у многих видов и демонстрирует принцип эволюции долговременной пластичности.

Различная роль нейромодуляции в сигнальной и контекстной памяти

Экспериментальный анализ изменений в активности индивидуально идентифицируемых нейронов, участвующих в сетях, лежащих в основе поведения при пищедобывательном и оборонительном поведении наземных улиток, до, во время и после аверсивного обучения *in vitro* показал, что реакции на пищу в «усиливающих» серотонинергических нейронах, участвующих в оборонительном поведении, значительно изменились после обучения, подразумевая, что эти серотонинергические клетки участвуют в реактивации памяти и в запуске процесса реконсолидации [32].

С использованием специфического для серотонинергических нейронов нейротоксина 5,7-DiHT (5,7-dihydroxytryptamine), который нарушает функционирование серотонинергической системы у улитки, было показано, что серотонинергические нейроны необходимы для формирования аверсивной памяти, но не являются необходимыми для поддержания и извлечения этой памяти [6]. В поведенческих экспериментах было показано, что нарушение функционирования серотонинергической системы 5,7-DiHT не влияло на поддержание памяти. При однократном тестировании через несколько дней после нарушения серотонинергической системы память присутствует, но несколько дней тестирования (напоминание один раз в день) привели к полному исчезновению контекстуальной памяти, в то время как у контрольных животных из-за процесса реконсолидации память не исчезла [32]. Сигнальная память на запахи пищи была значительно снижена в условиях нарушения серотонинергической системы, но все еще оставалась статистически значимой после повторной реактивации. Полученные результаты позволяют предположить, что угасание памяти (забывание) может быть результатом отсутствия активности в модуляторных нейронах при восста-

новлении памяти. Мы приходим к выводу, что участие «усиливающих» серотонинергических нейронов в восстановлении памяти может быть ключевым условием для выбора между исчезновением/реконсолидацией для контекстной памяти, но не для сигнальной памяти [32]. Адаптивная ценность независимости сигнальных компонентов и контекста очевидна: животные могут воспринимать один и тот же условный стимул в другом контексте как новый и готовы (сенситизированы) реагировать даже на слабые вредные стимулы в контексте, связанном с оборонительным поведением. В процессе обучения животное приобретает информацию о контексте, в котором оно получает подкрепление, и самостоятельно сохраняет информацию о некоторых специфических (сигнальных) стимулах, которые связаны с подкреплением и конкретным контекстом.

Заключение

Анализ опубликованных данных позволяет сделать вывод, что наземные улитки развили новые структуры в значительно большей по количеству нейронов нервной системе, чтобы адаптироваться к новой среде обитания в онтогенезе. Поведение этих животных качественно отличается от поведения водных брюхоногих моллюсков и включает в себя возможность активного взаимодействия с другими животными, демонстрацию интереса активным подходом, инструментальное поведение, направленное на получение внутримозговой стимуляции (самостимуляции), активное бегство в определенных случаях. У этих животных можно развить практически все виды ассоциативной памяти, продемонстрировать феномен реконсолидации памяти, проанализировать механизмы формирования, поддержания и модификации памяти. На уровне функционально идентифицированных нейронов и нейронных кластеров можно исследовать ассоциативные процессы *in vitro*. Для них разработана минимальная 3-нейронная модель ассоциативных изменений синаптической эффективности.

Работа выполнена в рамках госзадания МОН по теме №122011700257-6. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сахаров Д. А. *Генеалогия нейронов*. Москва: Наука; 1974. 183 с.
2. Chase R. *Behavior and its neural control in gastropod mollusks*. Oxford: Oxford Univ. Press; 2002. 336 pp.
3. Zakharov I.S., Hayes N.L., Ierusalimsky V.N., Nowakowski R.S., Balaban P.M. Postembryonic neuro-

genesis in the procerebrum of the terrestrial snail, *Helix* L. *J. Neurobiol.* 1998;35(3):271–276.

4. Spallanzani L. *Memorie su la respirazione*, vol. 1, vol. 2. Milano: Annesio Nobili; 1803. 373 pp.

5. Satoshi W., Kirino Y., Gelperin A. Neural and molecular mechanisms of microcognition in *Limax*. *Learn. Mem.* 2008;15(9):633–642.

6. Balaban P.M., Vehovszky A., Maximova O.A., Zakharov I.S. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine on the food-aversive conditioning in the snail *Helix lucorum* L. *Brain. Res.* 1987;404(1–2):201–210.
7. Adamo S. A., Chase R. The interactions of courtship, feeding, and locomotion in the behavioral hierarchy of the snail *Helix aspersa*. *Behav. Neur. Biol.* 1991;55(1):1–18.
8. Chase R. Brain cells that command sexual behavior in the snail *Helix aspersa*. *J. Neurobiol.* 1986;17(6):669–679.
9. Balaban P., Chase R. Stimulation of mesocerebrum in *Helix aspersa* inhibits the neural network underlying avoidance behavior. *J. Compar. Physiol. A.* 1990;166(3):421–427.
10. Willows A.O. Behavioral acts elicited by stimulation of single, identifiable brain cells. *Science.* 1967;157(3788):570–574.
11. Balaban P.M. System of command neurons in snail's escape behavior. *Acta Neurobiol. Exp.* 1979;39(2):97–107.
12. Malyshev A.Y., Balaban P.M. Identification of mechanoafferent neurons in terrestrial snail: response properties and synaptic connections. *J. Neurophysiol.* 2002;87(5):2364–2371.
13. Balaban P.M., Bravarenko N.I., Maksimova O.A., Nikitin E., Ierusalimsky V.N., and Zakharov I.S. A single serotonergic modulatory cell can mediate reinforcement in the withdrawal network of the terrestrial snail. *Neurobiol. Learn. Memory.* 2001;75(1):30–50.
14. Balaban P.M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2002;26(5):597–630.
15. Никитин Е.С., Балабан П.М. Структурно-функциональная организация сети серотонинергических нейронов наземной улитки. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова.* 2011;61(6):750–762.
16. Kupfermann I., Weiss K. The command neuron concept. *Behav. Brain. Sci.* 1978;1(1):3–39.
17. Kupfermann I., Weiss K. Motor program selection in simple model systems. *Current Opin. Neurobiol.* 2001;11(6):673–677.
18. Vehovszky A.L., Elekes H., Balaban P. Serotonergic input on identified command neurons in *Helix*. *Acta. Biol. Hungarica.* 1993;44(1):97–101.
19. Zakharov I.S., Ierusalimsky V.N., Balaban P.M. Pedal serotonergic neurons modulate the synaptic input of withdrawal interneurons of *Helix*. *Invertebrate Neurosci.* 1995;1(1):41–52.
20. Hawkins R.D., Son H., Arancio O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Progress Brain Res.* 1998;118:155–172.
21. Colwill R.M., Absher R. A., Roberts M.L. Context-US learning in *Aplysia Californica*. *J. Neurosci.* 1988;8(12):4434–4439.
22. Balaban P., Bravarenko N. Long-term sensitization and environmental conditioning in terrestrial snails. *Exp. Brain Res.* 1993;96(3):487–493.
23. Sahley C.L., Martin K.A. Analysis of associative learning in the terrestrial mollusc *Limax maximus*. II. Appetitive learning. *J. Comp. Physiol. A, Sens. Neur. Behav. Physiol.* 1990;167(3):339–345.
24. Balaban P.M., Chase R. Self-stimulation in snails. *Neurosci. Res. Com.* 1989;4(3):139–143.
25. Gainutdinova T.H., Tagirova R.R., Ismailova A.I., Muranova L.N., Samarova E.I., Gainutdinov K.L., Balaban P.M. Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis. *Learn. Mem.* 2005;12(6):620–625.
26. Balaban P., Chase R. Interrelationships of the emotionally positive and negative regions of the brain of the edible snail. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1991;21(2):172–180.
27. Balaban P. Behavioral neurobiology of learning in terrestrial snails. *Progress Neurobiol.* 1993;41(1):1–19.
28. Иерусалимский В.Н., Захаров И.С., Балабан П.М. Сравнение серотонин- и дофаминергической нейронных систем у половозрелых и ювенильных наземных моллюсков *Helix* и *Eobania*. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова.* 1997;47(3):563–576.
29. Balaban P.M., Korshunova T.A., Bravarenko N.I. Postsynaptic calcium contributes to reinforcement in a three-neuron network exhibiting associative plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 2004;19(2):227–233.
30. Glanzman D.L., Mackey S.L., Hawkins R.D., Dyke A.M., Lloyd P.E., Kandel E.R. Depletion of serotonin in the nervous system of *Aplysia* reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as the heterosynaptic facilitation produced by Tail Shock. *J. Neurosci.* 1989;9(12):4200–4213.
31. Hammer M., Menzel R. Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci.* 1995;15(3 Pt. 1):1617–1630.
32. Balaban P.M., Vinarskaya A.K., Zuzina A.B., Ierusalimsky V.N., A. Y. Malyshev A.Y. Impairment of the serotonergic neurons underlying reinforcement elicits extinction of the repeatedly reactivated context memory. *Sci. Rep.* 2016;6(1):36933.

Поступила в редакцию 02.04.2024

После доработки 31.05.2024

Принята в печать 10.06.2024

REVIEW

Complex “simple nervous systems”

D.Yu. Afanasyeva, P.M. Balaban* 

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
Butlerova 5a, Moscow, 117485, Russia*

*e-mail: pmbalaban@gmail.com

Terrestrial gastropods have evolved new structures in the nervous system compared to marine and aquatic snails in order to adapt to their new habitat. The behavior of these animals is qualitatively different from the behavior of aquatic gastropods, includes not only the possibility of active interaction with other animals, but also the demonstration of interest by active

approach, avoidance or escape in certain cases. The “arrow of love” used in copulation is unique to Nature. Almost all types of associative memory can be formed in these animals, consolidation and reconsolidation of memory can be demonstrated, and mechanisms of memory maintenance and modification can be analyzed. At the level of functionally identified neurons and neural clusters, it is possible to study associative processes *in vitro*, a 3-neural model of associative long-term changes in synaptic efficiency has been developed.

Keywords: *neuron, synaptic plasticity, invertebrates, behavior, memory, reconsolidation*

Funding: The research was supported by the Scientific Project of the State Order of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation №122011700257-6.

Сведения об авторах

Афанасьева Дарья Юрьевна — лаборант ИВНД и НФ РАН, студент РНИМУ им. Пирогова. Тел.: 8-495-334-70-00; e-mail: daafanasyeva12@gmail.com

Балабан Павел Милославович — академик РАН, докт. биол. наук, гл. науч. сотр. ИВНД и НФ РАН. Тел.: 8-495-334-70-00; e-mail: pmbalaban@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9248-8207>



Осморегуляция и репродукция: эволюционные тренды функций пролактина от рыб к млекопитающим

О.В. Смирнова¹ , П.А. Абрамичева² , Н.С. Павлова^{1,*}

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

²Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

*e-mail: pav.nad.ser@gmail.com

Изучение эволюции функций пролактина дает ключ для понимания разнообразия эффектов этого гормона у млекопитающих в норме и патологии, что актуально как с теоретической, так и с практической точки зрения. В статье представлен обзор собственных и литературных данных, касающихся роли пролактина и его рецепторов в регуляции половых особенностей пресноводной адаптации трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. Продемонстрировано, что экспрессия мРНК гена пролактина 1 (одного из двух паралогов пролактина) и его рецептора PRLRA в мозге растет только у самок колюшки при переходе в пресную воду. Мозг и почка колюшки как андрогензависимые органы характеризуются зависимой от пола экспрессией *Prlra* в морской воде. Предполагается, что через рецептор PRLRA в этих органах осуществляются зависимые от пола осморегуляторные эффекты пролактина. Рецептор PRLRB в условиях морской воды экспрессируется в почке и мозге колюшки независимо от пола, однако экспрессия этого рецептора более чувствительна к снижению солености. Очевидно, рецептор PRLRB принимает более активное участие в реализации независимых от пола осморегуляторных функций пролактина. Жабры и кишечник как осморегуляторные органы экспрессируют рецепторы PRLRA и PRLRB независимо от пола и в морской, и в пресной воде. При пресноводной адаптации параллельно растет экспрессия *Prl1* в мозге самок и экспрессия *Atp1a1* (гена $\alpha 1a$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы), *Nhe3* (гена натрий-протонного антипорта NHE3) и *Escac* (гена эпителиального кальциевого канала ECAC) в их жабрах. Предполагается, что эти гены жабр находятся под позитивным контролем пролактина. Поиск возможности реализации осморегуляторной функции пролактина у млекопитающих показал, что она может проявляться в условиях таких типов патологий, которые сопровождаются повышенной экспрессией изоформ рецептора пролактина в органах, участвующих в осморегуляции. Одной из таких патологий является холестаз самок крыс. Он сопровождается ростом экспрессии изоформ *Prlr* и изменением активности и соотношения субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы в почке. Таким образом, у рыб осморегуляторная функция пролактина зависит от пола, а у млекопитающих может проявляться в условиях нарушения водно-солевого обмена.

Ключевые слова: пролактин, рецепторы пролактина, осморегуляция, репродукция, рыбы, млекопитающие

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-10

Список сокращений:

мРНК – матричная РНК, транскрипт гена;
Ar – ген андрогенового рецептора AR (Androgen Receptor);
Atp1a1 – ген $\alpha 1a$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы;
Escac – ген эпителиального кальциевого канала ECAC (Epithelial Ca^{2+} Channel);
 ECAC – эпителиальный кальциевый канал;
Ncc – ген Na^+/Cl^- -котранспортера NCC (Na^+/Cl^- cotransporter);

NCC – Na^+/Cl^- -котранспортер;
 NHE – Na^+/H^+ -обменник, общее название для класса переносчиков;
Nhe2 – ген Na^+/H^+ -обменника NHE2 (Sodium-Hydrogen Exchanger 2);
 NHE2 – Na^+/H^+ -обменник NHE2;
Nhe3 – ген Na^+/H^+ -обменника NHE3 (Sodium-Hydrogen Exchanger 3);
 NHE3 – Na^+/H^+ -обменник NHE3;
Nkcc1a – ген $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспортера 1 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 1);

NKCC1 – $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспортер 1;
Nkcc2a – ген $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспортера
 2($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 2);
 NKCC2 – $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспортер 2;
Pr1 – ген пролактина 1 (у рыб);
Prlr – ген пролактинового рецептора (у крыс);
Prlra – ген пролактинового рецептора А
 (у рыб);
 PRLRA – пролактиновый рецептор А (у рыб);
Prlrb – ген пролактинового рецептора В
 (у рыб);
 PRLRB – пролактиновый рецептор В (у рыб);
Socs3 – ген терминатора сигнализации про-
 лактина.

Введение

Прошло практически сто лет со времени открытия пролактина как гормона, регулирующего лактацию. С тех пор он традиционно считается «женским» половым гормоном млекопитающих. Однако пролактин продуцируется у всех классов позвоночных и у рыб является одним из главных регуляторов водно-солевого обмена, что является его наиболее древней функцией. Под действием пролактина происходит адаптация эвригалинных видов рыб к пресной воде за счет торможения выхода ионов во внешнюю среду, стимуляции поступления ионов из окружающей среды и ингибирования избыточного поступления воды в организм [1, 2]. Переход в пресную воду у эвригалинных видов рыб связан с изменениями репродуктивного цикла, что дает возможность предположить совместную эволюцию осморегуляторной и репродуктивной функции пролактина. У млекопитающих в норме регуляция водно-солевого обмена осуществляется другими гормонами. Спектр состояний, при которых пролактин у млекопитающих включается в регуляцию обмена воды и солей, также остается неясным. Нами высказывается гипотеза о том, что с одной стороны, действие пролактина на водно-солевой обмен у рыб зависит от пола, с другой стороны, – у млекопитающих существуют состояния, при которых проявляется его эволюционно древняя функция – участие в регуляции водно-солевого обмена. В данной работе представлены данные о зависимости от пола участия пролактиновой оси в регуляции водно-солевого обмена у рыб (на примере трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L.), что способствует их подготовке к размножению, а также данные об участии пролактина в регуляции водно-солевого обмена у млекопитающих в условиях патологии (на примере гиперпролактинемии, возникающей в модели холестаза).

Не вызывает сомнения, что пролактин необходим для пресноводной адаптации рыб. Это было установлено с помощью введения пролактина гипофизэктомированным рыбам, не выживаю-

щим без него в пресной воде [3–5]. У многих видов рыб мРНК пролактина в гипофизе и уровень пролактина в крови растет при пресноводной адаптации [6, 7]. Тем не менее, пролактиновая ось, ранее не считавшаяся связанной с полом рыбы в контексте пресноводной адаптации, может иметь гораздо более сложный механизм осуществления своих функций. Механизмы, обуславливающие адаптацию анадромных рыб к пресной воде во время миграции, остаются изученными не полностью, а известные общие принципы регуляции пролактином водно-солевого баланса у мигрирующих рыб требуют уточнения, поскольку могут существенно различаться у самок и самцов. Литературные данные позволяют оценить как изменения пролактиновой оси у самок и самцов колюшки при гипоосмотических условиях, так и половую специфичность реакции элементов пролактиновой оси на эти условия [8, 9].

У колюшки, как и у многих других видов рыб, ген пролактина имеет два паралога, которые называются пролактин 1 и пролактин 2. Установлено, что экспрессия *Pr1* при переходе в пресную воду растет только у самок колюшки, подтверждая его ключевую роль у женского пола [9, 10]. Характерный только для самок рост экспрессии *Pr1* в мозге при пресноводной адаптации может быть связан со стимулирующим влиянием эстрогенов, поскольку эстрогены являются позитивными регуляторами продукции пролактина не только у млекопитающих, но и у рыб [11, 12]. Косвенным подтверждением этого является статистически значимый рост гепатосоматического индекса (относительной массы печени) при пресноводной адаптации самок колюшки и его значимо более высокий уровень и в морской, и в пресной воде по сравнению самцами. Также наблюдается статистически значимая положительная корреляция между гепатосоматическим индексом и экспрессией гена пролактина в мозге самок [13, 14]. Данный индекс у рыб является показателем эффективности действия эстрогенов на печень как главных стимуляторов печеночного вителлогенеза [15–17]. Известно, что снижение осмолярности плазмы при переходе в пресную воду сопровождается ростом объема пролактиновых клеток гипофиза, открытием чувствительных к растяжению кальциевых каналов, ростом внутриклеточного кальция и ростом секреции пролактина, а также повышением экспрессии его генов, что приводит к повышению продукции пролактина [18–21]. Этот механизм дополнительно стимулируется у самок под действием эстрогенов при длительной (для колюшки – в течение 72 ч) пресноводной адаптации, при которой необходимо поддержание стабильно высокой концентрации пролактина в плазме крови.

У самцов колюшки нефросоматический индекс (относительная масса почек) является пока-

зателем эффективности действия андрогенов на почку. В период нереста именно андрогены стимулируют в почке синтез спиггина, необходимого для строительства самцами гнезда, в котором в дальнейшем самки будут откладывать икру [22]. Судя по нефросоматическому индексу самцов, существенно превышающему этот показатель у самок, эффективность действия андрогенов на почку самцов очень высока в период нереста и не меняется при переходе в пресную воду. Также у самцов обнаружена корреляция между нефросоматическим индексом и экспрессией гена пролактина в мозге [10, 14]. Отсутствие как изменений эффективности действия андрогенов, так и экспрессии пролактина в мозге самцов при пресноводной адаптации свидетельствует об отсутствии изменений их регуляторных взаимовлияний в условиях низкой солености [9].

У колюшки, как и у других рыб, в тканях экспрессируется два рецептора пролактина PRLRA и PRLRB, которые являются продуктами двух разных генов [23]. Эффективность действия пролактина зависит не только от уровня экспрессии *Prl1* в мозге, но и от уровня экспрессии *Prlra* и *Prlrb* в тканях-мишенях. Такие ткани у колюшки можно разделить на ткани, участвующие в регуляции размножения и в регуляции водно-солевого обмена (мозг, почка как андрогензависимый орган), и ткани, участвующие только в регуляции водно-солевого обмена (жабры, кишечник). Поэтому особенно интересным было исследование изменений экспрессии *Prlra* и *Prlrb* в этих органах при пресноводной адаптации.

В морской воде у колюшки экспрессия *Prlra* выше в мозге самцов [9]. Статистически значимый рост экспрессии *Prl1* и *Prlra* в мозге самок колюшки при пресноводной адаптации позволяет предположить, что пролактин стимулирует экспрессию *Prlra*, уравнивая чувствительность к пролактину по этому параметру с самцами в условиях пресной воды [24]. В результате пролактин в пресной воде более эффективно действует на мозг самок за счет увеличения экспрессии *Prl1* и *Prlra*. Поскольку экспрессия *Prl1* в мозге самцов не меняется при пресноводной адаптации, не наблюдается и значимых изменений экспрессии *Prlra* в мозге [9].

Prlrb мозга в морской воде экспрессируется на одном уровне у самок и самцов колюшки. Пресноводная адаптация значимо повышает экспрессию *Prlrb* только в мозге самок, хотя половые различия его экспрессии не достигают статистически значимого уровня [9].

Другие закономерности наблюдаются для экспрессии *Prlra* в почке колюшки. В этом случае выявляется зависимость от пола с преобладанием экспрессии у самок, причем и в морской, и в пресной воде, при полном отсутствии влияния снижения солености [14]. Судя по литературным данным, продукция андрогенов у гото-

вых к нересту самцов колюшки сильно повышена и дополнительно не увеличивается при пресноводной адаптации [25]. В этой связи значимо более низкий (чем у самок) уровень экспрессии *Prlra* в почке самцов в условиях разной солености может быть связан с негативным действием высокого уровня андрогенов на этот рецептор в почке самцов. Этому способствует то, что в почке самцов колюшки в этот период андрогенный рецептор *Ar* экспрессируется на самом высоком уровне по сравнению с другими исследованными тканями [25–27].

Ген *Prlrb* в условиях морской воды экспрессируется в почке, также, как и в мозге, практически на одном уровне у самок и самцов колюшки [14, 24]. При пресноводной адаптации наблюдаются противоположные изменения экспрессии *Prlrb* у самцов и самок. Экспрессия *Prlrb* в почке самцов статистически значимо и существенно снижается, а в почке самок, наоборот, статистически значимо растет. Это является причиной появления половых различий экспрессии *Prlrb* почки при переходе в пресную воду с существенным преобладанием у самок. Рост экспрессии *Prlrb* в почке самок в пресной воде может быть связан с позитивным влиянием пролактина, экспрессия которого растет у самок в этих условиях [8, 9]. Снижение экспрессии *Prlrb* в почке при пресноводной адаптации самцов не может быть обусловлено изменением влияния андрогенов, т.к. судя по нефросоматическому индексу, продукция андрогенов у самцов дополнительно не повышается при пресноводной адаптации. Не исключено, что чувствительность почки к андрогенам при пресноводной адаптации повышается. Известно также, что при переходе в пресную воду изменяется продукция не только пролактина, но и кортизола и тиреоидных гормонов [28, 29]. Возможно, модификация именно их продукции при переходе в пресную воду негативно сказывается на экспрессии *Prlrb* в почке самцов. Есть также вероятность, что регуляция экспрессии *Prlrb* в почке осуществляется за счет изменения осморлярности, что известно для регуляции экспрессии рецептора пролактина и некоторых транспортеров в осморегуляторных органах ряда видов рыб [30–32]. Таким образом, за счет более высокой экспрессии самого пролактина при пресноводной адаптации самок и роста экспрессии *Prlrb* в их почке эффективность действия пролактина через рецептор PRLRB почки существенно растет в пресной воде у самок по сравнению с самцами.

Суммируя, можно сказать, что мозг и почка колюшки как органы, сочетающие регуляцию водно-солевого обмена и репродукции, характеризуются зависимой от пола экспрессией *Prlra* при пребывании в морской воде. Кроме того, для мозга характерно повышение экспрессии *Prlra* у самок при пресноводной адаптации, как и рост

экспрессии гена самого пролактина. Это дает возможность предположить, что именно через рецептор PRLRA в этих органах осуществляются различные у самок и самцов осморегуляторные эффекты пролактина. В случае *Prlrb*, в отличие от *Prlra*, зависимости от пола не наблюдается при пребывании в морской воде ни в мозге, ни в почке. Однако экспрессия *Prlrb* более чувствительна к снижению солёности. Очевидно, этот рецептор принимает более активное участие в реализации независимых от пола осморегуляторных функций пролактина. При этом статистически значимый рост экспрессии *Prlrb* в мозге, и в почке самок при пресноводной адаптации параллельно с ростом экспрессии *Prl1* в мозге позволяет предположить, что пролактин является позитивным регулятором этого рецептора в данных тканях.

В отличие от органов, участвующих и в регуляции водно-солевого обмена, и в регуляции репродукции, в жабрах колюшки как одном из основных осморегуляторных органов экспрессия гена и *Prlra*, и *Prlrb* стабильна и не зависит ни от пола колюшки, ни от солёности среды. Тем не менее, эффективность действия пролактина на жаберы в пресной воде также более высока у самок колюшки за счет повышенной экспрессии *Prl1* [33].

В кишечнике, так же, как и в жабрах, экспрессия *Prlra* стабильна и не зависит ни от пола, ни от пресноводной адаптации [33]. На экспрессию *Prlrb* в кишечнике пол особи также не влияет ни в морской, ни в пресной воде [33]. Однако его экспрессия в кишечнике, так же, как и в почке, и в мозге чувствительна к изменению солёности и в одинаковой степени статистически значимо снижается у обоих полов при пресноводной адаптации.

Таким образом, жаберы и кишечник как осморегуляторные органы экспрессируют рецепторы *Prlra* и *Prlrb* независимо от пола и в морской, и в пресной воде. В этом случае зависимость от пола осморегуляторных функций пролактина связана только с ростом экспрессии *Prl1* в мозге самок при пресноводной адаптации. В отличие от них в мозге и почке, сочетающих регуляцию водно-солевого обмена и репродукции, суммарный вектор зависимо от пола влияния пролактина складывается с одной стороны из ползависимого изменения экспрессии пролактина в мозге, с другой стороны, из зависимой от пола экспрессии *Prlra* в данных тканях.

Остается открытой проблема зависимости от пола белков-транспортёров, участвующих в регуляции водно-солевого обмена у рыб на уровне жабр, также, как и роль пролактина в формировании такой зависимости. Тем более не были исследованы изменения половых особенностей экспрессии этих транспортёров при пресноводной адаптации.

Известно, что активный транспорт натрия в кровь осуществляется в жабрах под действием

Na^+/K^+ -АТФазы, экспрессия субъединиц которой в клетках жабр по-разному меняется у разных видов рыб в зависимости от изменения солёности воды и длительности пресноводной адаптации [34–36]. Установлено также, что экспрессия этого фермента может регулироваться половыми стероидами. Так, этилэстрадиол стимулирует экспрессию $\alpha 1b$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах самок медаки. Другие субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы также регулируются этилэстрадиолом в зависимости от пола [37]. В исследованиях изменения экспрессии субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы жабр в зависимости от пола и пресноводной адаптации установлено, что в морской воде экспрессия $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы жабр не зависит от пола, а экспрессия $\alpha 3$ -субъединицы у самок статистически значимо выше, чем у самцов [33]. При трехдневной пресноводной адаптации в жабрах самок статистически значимо повышается экспрессия $\alpha 1a$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, что ведет к появлению половых различий; экспрессия $\alpha 3a$ -субъединицы в жабрах самок изменяется таким образом, что, наоборот, выявляемая в морской воде зависимость от пола исчезает [33]. Экспрессия $\alpha 2$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы у обоих полов выявляется на разрешающей границе метода и слабо зависит от исследуемых параметров [33]. Таким образом, и в условиях морской воды, и после пресноводной адаптации у самок и самцов наблюдается различный вклад $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы в реализацию осморегуляторной функции жабр. При переходе в пресную воду именно у самок вклад разных вариантов α -субъединицы в работу Na^+/K^+ -АТФазы существенно меняется. Учитывая сильный рост экспрессии пролактина 1 в мозге самок при пресноводной адаптации и сходный рост $\alpha 1$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы в этих условиях, можно предположить, что эта субъединица находится у самок под регуляторным влиянием пролактина 1. Это подтверждается наличием статистически значимой положительной корреляции между экспрессией *Prl1* в мозге и экспрессией *Atp1a1* в жабрах самок в ходе 24- и 72-часовой пресноводной адаптации. Рост экспрессии *Atp1a1*, *Atp1a2* и *Atp1a3* жабр при пресноводной адаптации выявлен и у некоторых других видов рыб, но без учета половых особенностей [36, 38].

В морской воде хлоридные клетки жабр активно секретируют ионы хлора и натрия в окружающую среду с помощью двух вариантов $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспортёра (NKCC1 и NKCC2), работу которого обеспечивает, в частности Na^+/K^+ -АТФаза. В этой связи у большинства видов костистых рыб экспрессия *Nkcc1a* и *Nkcc2a* в жабрах высока в морской воде и низка в пресной [39–41]. В опытах по пресноводной адаптации колюшки экспрессия гена *Nkcc1a* в жабрах

также статистически значимо снижалась, причем независимо от пола [42]. Экспрессия гена *Nkcc2a* в жабрах у обоих полов была стабильно низкой в условиях разной солености и также не зависела от пола [42]. Известно, что *Nkcc2a* у колюшки экспрессируется в основном в почке и кишечнике, а у млекопитающих является специфичной для почки изоформой [43, 44].

В пресной воде происходит модификация морфологии и функций хлоридных клеток жабр, и они начинают осуществлять активный захват ионов натрия и хлора. Механизмы захвата ими ионов натрия включают работу Na^+/H^+ -обменника (NHE) и Na^+/Cl^- -котранспортера (NCC) [40]. Натрий-протонный обменник NHE в жабрах рыб представлен в основном двумя изоформами NHE2 и NHE3 [45, 46]. У колюшек экспрессия гена *Nhe3* в жабрах в условиях морской воды между самками и самцами не различалась. Однако в условиях долговременной пресноводной адаптации его экспрессия статистически значимо росла только у самок, приводя к появлению половых различий экспрессии [42]. Учитывая выявленный рост экспрессии *Pr11* в мозге самок при пресноводной адаптации, а также данные о стимуляции эстрогенами экспрессии *Pr11* в мозге [47, 48], можно предположить, что появление таких половых различий связано с повышенной эффективностью действия пролактина на экспрессию *Nhe3* в жабрах самок. В то же время экспрессия *Nhe2* была относительно стабильной и не зависела ни от пола, ни от пресноводной адаптации [42]. Таким образом, можно сделать вывод, что перестройка работы хлоридных клеток жабр колюшки при пресноводной адаптации связана главным образом с изменением экспрессии *Nhe3*. Об этом свидетельствует также низкая и не зависящая от пола экспрессия *Ncc* в жабрах в морской воде и статистически незначимый рост экспрессии этого транспортера при пресноводной адаптации [42].

Эпителиальный кальциевый канал ECAC относится к семейству TRP-каналов, играет определяющую роль в захвате ионов кальция, а кодирующий его ген *Ecac* экспрессируется в основном в жабрах и в меньшей степени в почках рыб. Обычно экспрессия *Ecac* в жабрах и почке костистых рыб растет при снижении содержания ионов кальция в воде [46, 49]. В условиях морской воды выявлены существенные половые различия экспрессии этого транспортера в жабрах с преобладанием у самцов [42]. При пресноводной адаптации эти половые различия исчезают за счет противоположных изменений экспрессии *Ecac* у самок и самцов. Важно, что введение гетерологичного пролактина овцы, обладающего сродством к рецепторам пролактина рыб [50], ведет к таким же последствиям. Установлено, что между экспрессией *Pr11* в мозге и экспрессией *Ecac* в жабрах самок колюшек в ходе пресноводной адаптации наблюдается статистиче-

ски значимая положительная корреляция [42]. Это позволяет предположить, что рост экспрессии *Ecac* в жабрах самок при пресноводной адаптации, также связан с повышением экспрессии *Pr11* в мозге самок колюшки в пресной воде.

Таким образом, учитывая, что пресноводная адаптация ведет к росту экспрессии *Pr11* в мозге самок, *Atp1a1* и *Ecac* в их жабрах и что между экспрессией *Pr11* в мозге и этими транспортерами в жабрах есть статистически значимые положительные корреляции, можно с достаточной долей уверенности предположить, что эти гены жабр находятся под позитивным контролем пролактина.

Второй задачей было изучение участия пролактина и его рецепторов в регуляции водно-солевого обмена у млекопитающих в условиях патологии. Объектом интереса была выбрана почка самок крыс, т.к. именно в случае самок колюшки обнаруживается высокая экспрессия *Pr1ra* в почке. Кроме того, в почке крыс уже была обнаружена возможность натрийуретического действия пролактина совместно с дофамином, а также выявлены рецепторы пролактина на уровне белка с помощью иммуногистохимического анализа и вестерн-блоттинга [51–53]. В почке самок крыс детектированы обе изоформы рецептора пролактина (длинная и короткая) [54]. В качестве патологического состояния, при котором, предположительно, будет виден вклад пролактина в регуляцию водно-солевого обмена у млекопитающих, по нескольким причинам был выбран холестаз. Во-первых, холестаз наблюдается преимущественно у женщин, при этом из-за нарушения работы печени существенная нагрузка ложится на почки, причем значительно модифицируется регуляция почкой водно-солевого обмена. Во-вторых, холестаз сопровождается ростом уровня эстрогенов и пролактина в крови, что показано на крысиной модели холестаза [55].

Уровень экспрессии изоформ *Pr1r* в почках млекопитающих (на примере крыс) растет при холестазе, существенно увеличивая чувствительность этого органа к действию пролактина [54, 56]. У самок крыс в модели холестаза, индуцированного 14-дневной перевязкой общего желчного протока, существенно растет экспрессия и короткой, и длинной изоформ транскрипта *Pr1r* в мозговом слое, а также короткой изоформы в коре почки [54]. Одним из доказательств такого усиления эффективности действия пролактина на почку в условиях холестаза является повышение экспрессии терминатора сигнализации пролактина *Socs3* [54], имеющего STAT-чувствительные элементы в регуляторной области гена [56], т.е. прямо и позитивно регулируемого пролактином.

Увеличение экспрессии обеих изоформ транскрипта *Pr1r* в почке крыс при холестазе сопровождается статистически значимым повышением натрийуреза [55]. Исследование изменений

экспрессии *Prll* в мозге и *Atp1a1* в жабрах самок колюшки при пресноводной адаптации позволило думать, что $\alpha 1$ -субъединица Na^+/K^+ -АТФазы находится под регуляторным влиянием пролактина 1 (см. выше). Предполагается, что при холестазае в почке самок также может выявляться связь между повышением чувствительности к пролактину и изменением экспрессии и активности Na^+/K^+ -АТФазы. Действительно, экспрессия и активность $\alpha 1$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы снижалась в мозговом слое почки самок крыс при холестазае [57], что может быть одной из причин роста натрийуреза в условиях повышенной чувствительности почки к пролактину. Также показано прямое влияние пролактина на активность Na^+/K^+ -АТФазы изолированных сегментов проксимальных канальцев [51].

Очевидно, влияние пролактина на работу и соотношение субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы у млекопитающих может проявляться при его высоком

физиологическом или патологическом уровне и вносить существенный вклад в гормональную регуляцию водно-солевого обмена в условиях высокого уровня экспрессии изоформ транскрипта *Prlr* в органах, участвующих в осморегуляции.

Таким образом, данный обзор демонстрирует, каким способом при заболеваниях гепатобилиарной системы эволюционно древние функции пролактина начинают выходить на передний план и вносить существенный вклад в регуляцию водно-солевого обмена, в то время как в норме у млекопитающих основной вклад в регуляцию водно-солевого обмена вносят другие гормоны.

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032300075-6. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Breves J.P., McCormick S.D., Karlstrom R.O. Prolactin and teleost ionocytes: new insights into cellular and molecular targets of prolactin in vertebrate epithelia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014;203:21–28.
2. Seale A.P., Pavlosky K.K., Celino-Brady F.T., Yamaguchi Y., Breves J.P., Lerner D.T. Systemic versus tissue-level prolactin signaling in a teleost during a tidal cycle. *J. Comp. Physiol. B.* 2019;189(5):581–594.
3. Breves J.P., Watanabe S., Kaneko T., Hirano T., Grau E.G. Prolactin restores branchial mitochondrion-rich cells expressing Na^+/Cl^- cotransporter in hypophysectomized Mozambique tilapia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010;299(2):R702–R710.
4. Manzon L.A. The role of prolactin in fish osmoregulation: A review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2002;125(2):291–310.
5. Power D.M. Developmental ontogeny of prolactin and its receptor in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005;142(1–2):25–33.
6. Breves J.P., Seale A.P., Helms R.E., Tipsmark C.K., Hirano T., Grau E.G. Dynamic gene expression of GH/PRL-family hormone receptors in gill and kidney during freshwater-acclimation of Mozambique tilapia. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2011;158(2):194–200.
7. Lee K.M., Kaneko T., Aida K. Prolactin and prolactin receptor expressions in a marine teleost, pufferfish *Takifugu rubripes*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006;146(3):318–328.
8. Pavlova N.S., Gizatulina A.R., Neretina T.V., Smirnova O.V. Expression of opsin genes in the retina of female and male three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* L.: Effect of freshwater adaptation and prolactin administration. *Biochemistry (Mosc.)*. 2022;87(3):215–224.
9. Pavlova N.S., Neretina T.V., Smirnova O.V. Dynamics of prolactin axis genes in the brain of male and female three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Gasterostidae) during short-term freshwater adaptation. *J. Ichthyol.* 2020;60(2):299–304.
10. Павлова Н.С., Гизатулина А.Р., Неретина Т.В., Смирнова О.В. Пролактин адаптирует цветовое зрение у самок и самцов трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. при 72-часовой адаптации к пресной воде. *Труды X Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2021)», том III.* Тверь: ООО «ПолиПРЕСС»; 2021:69–75.
11. Henderson H.L., Hodson D.J., Gregory S.J., Townsend J., Tortorese D.J. Gonadotropin-releasing hormone stimulates prolactin release from lactotrophs in photoperiodic species through a gonadotropin-independent mechanism. *Biol. Reprod.* 2008;78(2):370–377.
12. Onuma T., Ando H., Koide N., Okada H., Ura-no A. Effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding growth hormone/prolactin/somatolactin family hormones and a pituitary-specific transcription factor in masu salmon pituitary cells *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005;143(2):129–141.
13. Павлова Н.С., Неретина Т.В., Смирнова О.В. Экспрессия пролактина и его рецепторов в мозге самок трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* в условиях смены солености воды. *Сборник избранных статей X и XI международных научно-практических конференций «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине».* СПб.: Изд-во Политех. ун-та; 2016:121–125.
14. Павлова Н.С., Неретина Т.В., Смирнова О.В. Динамика экспрессии генов пролактина в мозге самок и самцов трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* при 24-часовой пресноводной адаптации. *Научные труды II Объединенного научного форума (VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX российский симпозиум «Белки и пептиды»).* М.: Перо; 2019:191.
15. Greytak S.R., Tarrant A.M., Nacci D., Hahn M.E., Callard G.V. Estrogen responses in killifish (*Fundulus heteroclitus*) from polluted and unpolluted environments are site- and gene-specific. *Aquat. Toxicol.* 2010;99(2):291–299.
16. Lee Pow C.S.D., Yost E.E., Aday D.D., Kullman S.W. Sharing the roles: An assessment of Japanese medaka estrogen receptors in vitellogenin induction. *Environ. Sci. Technol.* 2016;50(16):8886–8895.

17. Zheng W., Xu H., Lam S.H., Luo H., Karuturi R.K.M., Gong Z. Transcriptomic analyses of sexual dimorphism of the zebrafish liver and the effect of sex hormones. *PLoS One*. 2013;8(1):e53562.
18. Seale A.P., Malintha G.H.T., Celino-Brady F.T., Head T., Belcaid M., Yamaguchi Y., Lerner D.T., Baltzegar D.A., Borski R.J., Stoytcheva Z.R., Breves J.P. Transcriptional regulation of prolactin in a euryhaline teleost: Characterisation of gene promoters through in silico and transcriptome analyses. *J. Neuroendocrinol.* 2020;32(11):e12905.
19. Liu N.-A., Liu Q., Wawrowsky K., Yang Z., Lin S., Melmed S. Prolactin receptor signaling mediates the osmotic response of embryonic zebrafish lactotrophs. *Mol. Endocrinol.* 2006;20(4):871–880.
20. Seale A.P., Mita M., Hirano T., Grau E.G. Involvement of the cAMP messenger system and extracellular Ca^{2+} during hyposmotically-induced prolactin release in the Mozambique tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011;170(2):401–407.
21. Watanabe S., Hirano T., Grau E.G., Kaneko T. Osmosensitivity of prolactin cells is enhanced by the water channel aquaporin-3 in a euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2009;296(2):R446–R453.
22. Hoffmann E., Walstad A., Karlsson J., Olsson P.-E., Borg B. Androgen receptor-beta mRNA levels in different tissues in breeding and post-breeding male and female sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012;10:23.
23. Dobolyi A., Oláh S., Keller D., Kumari R., Fazekas E.A., Csikós V., Renner É., Cservenák M. Secretion and function of pituitary prolactin in evolutionary perspective. *Front. Neurosci.* 2020;14:621.
24. Павлова Н.С., Неретина Т.В., Смирнова О.В. Динамика экспрессии генов пролактина и его рецепторов в мозге самок трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* при 24-часовой пресноводной адаптации. Третья молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». М.: Изд-во «Наука»; 2019.
25. Hoffmann E., Walstad A., Karlsson J., Olsson P.-E., Borg B. Androgen receptor-beta mRNA levels in different tissues in breeding and post-breeding male and female sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012;10:23.
26. Olsson P.-E., Berg A.H., von Hofsten J., Grahn B., Hellqvist A., Larsson A., Karlsson J., Modig C., Borg B., Thomas P. Molecular cloning and characterization of a nuclear androgen receptor activated by 11-ketotestosterone. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005;3:37.
27. Jolly C., Katsiadaki I., Le Belle N., Mayer I., Dufour S. Development of a stickleback kidney cell culture assay for the screening of androgenic and anti-androgenic endocrine disruptors. *Aquat. Toxicol.* 2006;79(2):158–166.
28. Seale L.A., Gilman C.L., Zavacki A.M., Larsen P.R., Inokuchi M., Breves J.P., Seale A.P. Regulation of thyroid hormones and branchial iodothyronine deiodinases during freshwater acclimation in tilapia. *Mol. Cell Endocrinol.* 2021;538:111450.
29. Culbert B.M., Regish A.M., Hall D.J., McCormick S.D., Bernier N.J. Neuroendocrine regulation of plasma cortisol levels during smoltification and seawater acclimation of Atlantic salmon. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2022;13:859817.
30. Nagarajan G., Aruna A., Chang Y.-M., Alkhamis Y.A., Mathew R.T., Chang C.-F. Effects of osmotic stress on the mRNA expression of prl, prlr, gr, gh, and ghr in the pituitary and osmoregulatory organs of black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(6):5318.
31. Inokuchi M., Breves J.P., Moriyama S., Watanabe S., Kaneko T., Lerner D.T., et al. Prolactin 177, prolactin 188, and extracellular osmolality independently regulate the gene expression of ion transport effectors in gill of Mozambique tilapia. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2015;309(10):R1251–R1263.
32. Yuan M., Jia Q., Wang T., Lu Q., Tang L., Wang Y., Lu W. Dynamic responses of prolactin, growth hormone and their receptors to hyposmotic acclimation in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017;254:8–13.
33. Павлова Н.С., Неретина Т.В., Смирнова О.В. Зависимость от пола экспрессии гена пролактина в мозге и генов Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. при пресноводной адаптации. Труды XII Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2023)». Тверь: ООО «ПолиПРЕСС»; 2024:3.
34. Kang C.-K., Tsai S.-C., Lee T.-H., Hwang P.-P. Differential expression of branchial Na^+/K^+ -ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2008;151(4):566–575.
35. Mundy P.C., Jeffries K.M., Fangue N.A., Connon R.E. Differential regulation of select osmoregulatory genes and Na^+/K^+ -ATPase paralogs may contribute to population differences in salinity tolerance in a semi-anadromous fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2020;240:110584.
36. Esbaugh A.J., Brix K.V., Grosell M. Na^+/K^+ -ATPase isoform switching in zebrafish during transition to dilute freshwater habitats. *Proc. R. Soc. B*. 2019;286(1903):20190630.
37. Wang X., Hill D., Tillitt D.E., Bhandari R.K. Bisphenol A and 17- α -ethinylestradiol-induced transgenerational differences in expression of osmoregulatory genes in the gill of medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 2019;211:227–234.
38. Hu Y.-C., Chu K.-F., Yang W.-K., Lee T.-H. Na^+ , K^+ -ATPase $\beta 1$ subunit associates with $\alpha 1$ subunit modulating a “higher-NKA-in-hyposmotic media” response in gills of euryhaline milkfish, *Chanos chanos*. *J. Comp. Physiol. B*. 2017;187(7):995–1007.
39. Esbaugh A.J., Cutler B. Intestinal Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter 2 plays a crucial role in hyperosmotic transitions of a euryhaline teleost. *Physiol. Rep.* 2016;4(22):e13028.
40. Inokuchi M., Hiroi J., Watanabe S., Lee K.M., Kaneko T. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2008;151(2):151–158.
41. Cutler C.P., Cramb G. Two isoforms of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes*. 2002;1566(1–2):92–103.
42. Павлова Н.С., Неретина Т.В., Смирнова О.В. Экспрессия генов $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ и Na^+/H^+ -транспортёров

в жабрах трехиглой колюшки: связь с полом и пресноводной адаптацией. Четвертая молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций»: Сборник материалов. М.: Изд-во Наука; 2023:80–81.

43. Madsen S.S., Weber C., Nielsen A.M., Mohiseni M., Bosssus M.C., Tipsmark C.K., Borg B. Sexual maturation and changes in water and salt transport components in the kidney and intestine of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2015;188:107–119.

44. Cutler C.P., Cramb G. Differential expression of absorptive cation-chloride-cotransporters in the intestinal and renal tissues of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 2008;149(1):63–73.

45. Liu S.-T., Horng J.-L., Lin L.-Y. Role of the basolateral Na⁺/H⁺ exchanger-2 (NHE2) in ionocytes of seawater-acclimated medaka (*Oryzias latipes*). *Front. Physiol.* 2022;13:870967.

46. Guh Y.-J., Lin C.-H., Hwang P.-P. Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation. *Excli J.* 2015;14:627–659.

47. Jeng Y.-J., Kochukov M., Watson C.S. Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter calcium and kinase responses, prolactin release, and membrane estrogen receptor trafficking in rat pituitary cells. *Environ. Heal.* 2010;9:61.

48. Amenyogbe E., Chen G., Wang Z., Lu X., Lin M., Lin A.Y. A review on sex steroid hormone estrogen receptors in mammals and fish. *Int. J. Endocrinol.* 2020;2020:5386193.

49. Takvam M., Wood C.M., Kryvi H., Nilsen T.O. Ion transporters and osmoregulation in the kidney of teleost fishes as a function of salinity. *Front. Physiol.* 2021;12:664588.

50. Dauder S., Young G., Bern H.A. Effect of hypophysectomy, replacement therapy with ovine prolactin, and

cortisol and triiodothyronine treatment on prolactin receptors of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1990;77(3):378–385.

51. Ibarra F., Crambert S., Eklöf A.-C., Lundquist A., Hansell P., Holtbäck U. Prolactin, a natriuretic hormone, interacting with the renal dopamine system. *Kidney Int.* 2005;68(4):1700–1707.

52. Смирнова О.В. Осморегуляторная функция пролактина у рыб и ее проекция на млекопитающих. *Усп. физиол. наук.* 2011;42(4):59–75.

53. Aleksandrova M.I., Kushnareva N.S., Smirnova O.V. Prolactin receptor expression in kidney tissue of female rats with cholestasis: the effect of hyperprolactinemia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012;153(4):448–451.

54. Abramicheva P.A., Balakina T.A., Morozov I.A., Schelkunova T.A., Smirnova O.V. Prolactin signaling pathways determining its direct effects on kidneys in the cholestasis of pregnancy model. *Biochemistry (Mosc.)* 2019;84(10):1204–1212.

55. Fidchenko Y.M., Kushnareva N.S., Smirnova O.V. Effect of prolactin on the water-salt balance in rat females in the model of cholestasis of pregnancy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014;156(6):803–806.

56. Abramicheva P.A., Smirnova O.V. Prolactin receptor isoforms as the basis of tissue-specific action of prolactin in the norm and pathology. *Biochemistry (Mosc.)* 2019;84(4):329–345.

57. Abramicheva P.A., Balakina T.A., Bulaeva O.A., Guseva A.A., Lopina O.D., Smirnova O.V. Role of Na⁺/K⁺-ATPase in natriuretic effect of prolactin in a model of cholestasis of pregnancy. *Biochemistry (Mosc.)* 2017;82(5):632–641.

Поступила в редакцию 26.03.2024

После доработки 21.05.2024

Принята в печать 01.06.2024

REVIEW

Osmoregulation and reproduction: evolutionary trends in prolactin functions from fish to mammals

O.V. Smirnova¹ , P.A. Abramicheva² , N.S. Pavlova^{1,*} 

¹Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1–40, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: pav.nad.ser@gmail.com

The study of prolactin function evolution provides key insights into the diverse effects of this hormone in mammals, both in health and disease, which is relevant from both theoretical and practical perspectives. This article reviews both original and literature data concerning the role of prolactin and its receptors in regulating the sexual dimorphism of freshwater adaptation in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. It is demonstrated that mRNA expression of prolactin gene 1 (one of two prolactin paralogs) and its receptor PRLRA increases in the brains of female sticklebacks only upon transitioning to freshwater. The brain and kidneys of sticklebacks, as androgen-dependent organs, exhibit sex-dependent expression of *Prlra* in seawater. It is suggested that sex-dependent osmoregulatory effects of prolactin are mediated through

the PRLRA receptor in these organs. The PRLRB receptor, expressed in the kidneys and brains of sticklebacks regardless of sex in seawater, shows increased sensitivity to reduced salinity, suggesting a more active role in implementing sex-independent osmoregulatory functions of prolactin. Gills and intestines, as osmoregulatory organs, express the PRLRA and PRLRB receptors independent of sex in both seawater and freshwater. With freshwater adaptation, there is a concurrent increase in the expression of *Prl* in the brains of females and the expression of *Atp1a1* ($\alpha 1a$ subunit of Na^+/K^+ -ATPase), *Nhe3* (NHE3 sodium-proton antiport gene), and *Ecac* (epithelial calcium channel gene) in their gills. It is presumed that these gill genes are under positive control by prolactin. Exploring the potential for prolactin's osmoregulatory function in mammals revealed that it may manifest in conditions such as pathologies accompanied by increased expression of prolactin receptor isoforms in osmoregulatory organs. One of such pathologies is cholestasis in female rats, which was associated with an increase in *Prlr* isoform expression and changes in activity and ratio of Na^+/K^+ -ATPase subunits in the kidney. Thus, it is concluded that in fish, the osmoregulatory function of prolactin is sex-dependent, while in mammals, it may manifest under conditions of disrupted water-salt exchange.

Keywords: *prolactin, prolactin receptors, osmoregulation, reproduction, fish, mammals*

Funding: The project was funded by MSU state assignment №121032300075-6.

Сведения об авторах

Смирнова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, зав. лаб. эндокринологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-36-78; e-mail: smirnova_ov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4251-2250>

Абрамичева Полина Александровна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории структуры и функции митохондрий отдела функциональной биохимии биополимеров НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-36-78; e-mail: abramicheva.polina@belozersky.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7556-1617>

Павлова Надежда Сергеевна — мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-36-78; e-mail: pav.nad.ser@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5619-2695>

ОБЗОР

УДК 612.13+591.112.3



Регуляция сокращения гладкомышечных клеток сосудов в раннем постнатальном онтогенезе

Д.К. Гайнуллина¹ , О.С. Тарасова^{1,2,*} , А.А. Швецова¹

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

²Кафедра физиологии и патологии, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 1

*e-mail: tarasovaos@my.msu.ru

Рост организма в раннем постнатальном онтогенезе связан с изменением функционирования многих систем, в том числе сердечно-сосудистой. Для кровеносной системы новорожденных характерны многочисленные структурные и функциональные особенности, что на системном уровне проявляется в существенно более низком артериальном давлении. В этом обзоре рассмотрены различия механизмов регуляции сокращения гладкомышечных клеток сосудов в раннем постнатальном онтогенезе и во взрослом возрасте, включая возрастные изменения функционирования ионных каналов, активность которых влияет на уровень мембранного потенциала и внутриклеточную концентрацию ионов кальция, а также изменения кальциевой чувствительности сократительного аппарата. Заключительный раздел обзора посвящен обсуждению вопроса о связи механизмов регуляции сокращения и дифференцировки гладкомышечных клеток сосудов во время их созревания.

Ключевые слова: тонус сосудов, ионные каналы, чувствительность сократительного аппарата к ионам кальция, активные формы кислорода, дифференцировка

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-11

1. Особенности системной гемодинамики в раннем постнатальном онтогенезе

Интенсивный рост организма в раннем постнатальном онтогенезе связан с изменением функционирования многих систем организма, включая сердечно-сосудистую. Так, уровень артериального давления (АД) в большом круге кровообращения у новорожденного ребенка (50 мм рт. ст.) примерно вдвое ниже, чем у взрослого человека (100 мм рт. ст.) [1], что благоприятно для функционирования еще не полностью сформированных артериальных сосудов и сердца, которые в период новорожденности содержат меньше мышечной и соединительной ткани, и поэтому высокое давление может повредить их. При этом минутный объем сердца у детей, родившихся в срок, в 10 раз меньше, чем у взрослых людей (500 мл/мин по сравнению с 5000 мл/мин) [2], однако в пересчете на единицу массы тела (3,5 и 70 кг соответственно) минутный объем оказывается вдвое выше у детей. Таким образом, удельное общее периферическое сопротивление сосудов у новорожденного ребенка составляет всего четверть значения этого показателя во взрослом возрасте, что связано как со структурными особенностями, так и с различиями

в регуляции сосудистого тонуса. Сходные особенности системной гемодинамики в раннем постнатальном онтогенезе были показаны в исследованиях на лабораторных животных [3, 4].

Низкое сопротивление сосудов в раннем постнатальном онтогенезе связано с незрелостью их симпатической иннервации [5], а также с влиянием оксида азота, который тонически продуцируется эндотелием сосудов многих органов [6–8]. Механизмы регуляции сокращения гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов также различаются в новорожденном и взрослом организмах. Можно сказать, что в периоде раннего постнатального онтогенеза в ГМК сосудов еще не завершился процесс дифференцировки – перехода от пролиферативного фенотипа к сократительному.

Взаимодействие миозина с актином при сокращении ГМК сосудов регулируется двумя механизмами. Быстрый сократительный ответ обусловлен повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [9, 10] в основном за счет его входа из внеклеточной среды и, как правило, связан со сдвигом мембранного потенциала (МП) в сторону деполяризации в результате изменения активности различных ионных каналов [11]. Вместе с тем под-

держание тонического сокращения ГМК часто происходит за счет повышения чувствительности сократительного аппарата к Ca^{2+} , этот феномен получил название Ca^{2+} -сенситизации [9, 10]. Благодаря Ca^{2+} -сенситизации достаточно большое по силе сокращение артериальной гладкой мышцы может поддерживаться в условиях, когда внутриклеточная концентрация Ca^{2+} существенно не повышается [9, 10]. Вклад Ca^{2+} -сенситизации в величину сокращения зависит от калибра артерии и/или сосудистого региона, к которому эта артерия принадлежит [12].

Как будет рассмотрено далее, в раннем постнатальном онтогенезе не до конца дифференцированные ГМК отличаются от ГМК сосудов взрослого организма по механизмам регуляции МП, и, следовательно, внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (рисунок). Кроме того, для ГМК сосудов развивающегося организма характерна высокая чувствительность сократительного аппарата к Ca^{2+} , что сказывается на их способности к поддержанию тонического сокращения (рисунок).

2. Особенности функционирования ионных каналов ГМК артерий в раннем постнатальном онтогенезе

2.1. Каналы, обеспечивающие поступление Ca^{2+} в ГМК

Вход Ca^{2+} через потенциал-управляемые кальциевые каналы является ключевым механизмом повышения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме ГМК при действии различных вазоконстрикторных веществ и развитии миогенного тонуса сосудов [11]. В гладкой мышце артерий обнаружены каналы L-, T- и P/Q-типа, из которых наиболее функционально важным является L-тип (L-type calcium channel, LTCC) [11, 13], и именно этот тип каналов лучше всего изучен в онтогенетическом аспекте (рисунок).

В целом, высокие уровни содержания и активности LTCC характерны для дифференцированных ГМК [14]. В изолированных ГМК аорты новорожденных крысят, в отличие от взрослых, ни деполяризация, ни активатор LTCC каналов BayK 8644 не вызывали возникновения входящего Ca^{2+} тока [15]. В соответствии с этим, количество

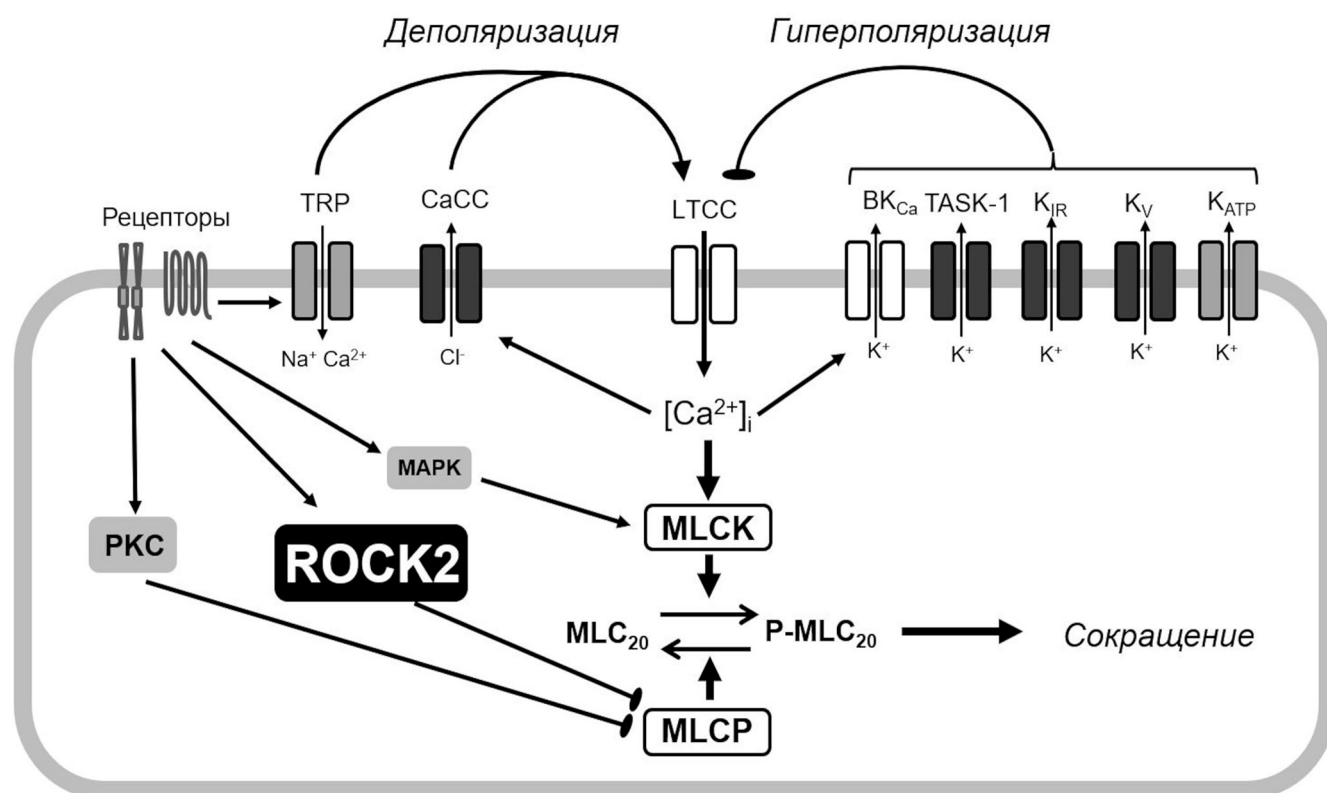


Рисунок. Основные механизмы регуляции сокращения ГМК сосудов и особенности их функционирования в раннем постнатальном онтогенезе. Изменения содержания/активности каналов/ферментов в ГМК новорожденного организма по сравнению со взрослым кодированы цветом заливки: темная заливка – увеличение, белая заливка – уменьшение, серая – нет выраженного изменения (или данных литературы по этому вопросу мало). Стрелки с острыми концами означают увеличение активности, стрелки с тупыми концами – уменьшение активности. MLC – myosin light chain, легкие цепи миозина; MLCK – myosin light chain kinase, киназа легких цепей миозина; MLCP – myosin light chain phosphatase, фосфатаза легких цепей миозина; PKC – protein kinase C, протеинкиназа C; MAPK – mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа; ROCK2 – Rho-киназа II, Rho-киназа II; TRP – transient receptor potential, неселективные катионные каналы; CaCC – Ca^{2+} -activated Cl^- channels, Ca^{2+} -активируемые Cl^- - каналы; LTCC – L-type Ca^{2+} -channel, потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы L типа; BK_{Ca} – large conductance Ca^{2+} -activated K^+ -channels, Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой проводимости; TASK-1 – the weak inward-rectifying K^+ (TWIK)-related acid-sensitive K^+ -channel; K_{IR} – inward-rectifier K^+ -channels, K^+ -каналы аномального выпрямления; K_{V} – voltage-gated K^+ -channels, потенциал-зависимые K^+ -каналы; K_{ATP} – ATP-sensitive K^+ -channels, АТФ-чувствительные K^+ -каналы.

LTCC в аорте новорожденных крысят составило всего 5% от такового у взрослых крыс [15]. У новорожденных кроликов реакции расслабления артерий брыжейки на блокатор LTCC были в несколько раз меньше, чем у взрослых [16]. У крыс содержание LTCC в ГМК мелких артерий брыжейки постепенно повышается в ходе постнатального развития: плотность тока через эти каналы увеличивается между 6 и 12 неделями жизни и не изменяется далее к 20-недельному возрасту [17]. Вместе с тем у овец, которые рождаются более зрелыми, не было обнаружено различий при сравнении количества LTCC в аорте доношенных плодов, новорожденных и взрослых животных [18].

Интересно, что артерии мозга демонстрируют противоположные изменения функциональной роли LTCC в процессе развития. Так, миогенный тонус артерий мозга новорожденных поросят преимущественно обусловлен притоком Ca^{2+} в ГМК через LTCC [19]. Эффекты активаторов и блокаторов LTCC на уровень внутриклеточного Ca^{2+} и индуцированное норадреналином сокращение средней мозговой артерии также были сильнее выражены у доношенных плодов, чем у взрослых овец [18, 20], что соотносится с данными о более высоком содержании LTCC в ткани артерий мозга в антенатальном периоде [18]. Сходные результаты были получены при исследовании возрастных изменений вазомоторной роли LTCC в артериях легких свиней и овец: уменьшение сократительных ответов под действием блокаторов этих каналов было более выраженным в перинатальном периоде развития [21, 22]. При исследовании LTCC в ГМК легочных артерий крыс на более поздних этапах онтогенеза (в возрасте 5–7, 10–12 и 19–23 недель) различий в плотности этих каналов не было выявлено [23]. Увеличение содержания и функциональной роли LTCC в артериях головного мозга и легких, в отличие от других системных артерий, может отражать особенности механизмов регуляции тонуса сосудов в этих органах или же неравномерность созревания регуляторных механизмов в различных сосудистых бассейнах.

В отличие от LTCC, потенциал-управляемые кальциевые каналы Т-типа более характерны для пролиферирующих ГМК [24], однако роль этих каналов в постнатальных изменениях сосудистой сократимости пока не изучена.

К рецептор-управляемым относятся каналы семейства TRP (Transient Receptor Potential), благодаря способности ряда представителей этого семейства активироваться под действием диацилглицерола [24]. Активация каналов TRP может непосредственно обеспечивать поступление Ca^{2+} в ГМК артерий, а также способствовать активации LTCC, создавая деполяризацию мембраны. Как правило, снижение степени дифференцировки ГМК в клеточной культуре или при некоторых сосудистых патологиях сопровождается многократ-

ным повышением содержания каналов TRP [24]. Вместе с тем в афферентных артериолах почки свиней с первых по 20-е сутки жизни наблюдалось повышение экспрессии каналов TRPC3, которое коррелировало с увеличением сократительных ответов этих артериол [25]. В целом вопрос о роли рецептор-управляемых Ca^{2+} -каналов в ГМК артерий в раннем постнатальном онтогенезе изучен мало.

2.2. Хлорные каналы

В связи с тем, что внутриклеточная концентрация Cl^- в ГМК сосудов относительно высока (в среднем, 30–50 мМ), равновесный потенциал для Cl^- оказывается более положительным по сравнению с потенциалом покоя [26, 27]. Таким образом, в ГМК Cl^- ток является деполяризующим и способствует сокращению [28–32]. Наиболее важным «путем» выхода Cl^- из ГМК артерий являются Ca^{2+} -активируемые Cl^- -каналы (CaCC), которые образованы белками TMEM16A и бестрофином-3 [33–35].

Роль CaCC в регуляции тонуса сосудов также изменяется в постнатальном онтогенезе (рисунок). Инкубация в бесхлорном растворе (для снижения концентрации Cl^- в ГМК), а также блокада CaCC с помощью MONNA приводили к ослаблению сократительных ответов подкожной артерии на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин, и эти эффекты были сильнее выражены в артериях 1-2-недельных крысят, чем в артериях взрослых крыс [32, 36]. В артериях крысят деполяризация ГМК под действием метоксамина полностью зависела от влияния тока Cl^- , а уровни экспрессии бестрофина-3 и TMEM16A, ответственных за Ca^{2+} -активируемую проводимость мембраны ГМК для Cl^- , были выше, чем во взрослом возрасте [32]. Таким образом, как деполяризация, так и сокращение при активации α_1 -адренорецепторов в большей степени зависят от CaCC в ГМК артерий 1-2-недельных крысят по сравнению со взрослыми крысами.

2.3. Калиевые каналы

Влияние выходящего калиевого тока в ГМК артерий противодействует сокращению (анти-констрикторное влияние) [11]. В ГМК артерий обнаружено 5 функциональных типов K^+ -каналов: (1) потенциал-управляемые (K_v , активируются при деполяризации мембраны), (2) входящего выпрямления (K_{ir} , пропускают K^+ внутрь клетки, если МП более отрицателен, чем E_K), (3) АТФ-зависимые (K_{ATP} , активируются при увеличении соотношения АДФ/АТФ в клетке), (4) с двумя порообразующими петлями (K_{2P} , «каналы утечки»), а также (5) Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой проводимости (BK_{Ca} , активируются деполяризацией и повышением внутриклеточного Ca^{2+}) [11].

ГМК различных артерий большого круга (аорта, подкожная артерия, средняя мозговая артерия) у крыс и овец в период раннего постнатального онтогенеза демонстрируют более выраженные реакции деполяризации и/или сокращения при блокаде каналов K_v1 , K_v7 , K_{ir2} , а также TASK-1 (представитель семейства каналов K_{2P}) по сравнению с артериями взрослых животных [37–41]. В первую очередь, это связано с увеличенной экспрессией этих каналов: содержание порообразующих ($K_v1.2$, $K_v7.4$, $K_{ir2.1}$, $K_{ir2.4}$, TASK-1) и регуляторных (KCNE4) субъединиц этих K^+ -каналов в ГМК артерий в раннем возрасте выше, чем во взрослом [37, 38, 40]. Следует отметить, что антиконстрикторное влияние каналов TASK-1 у 1-2-недельных животных проявляется и на системном уровне – в более выраженном влиянии блокатора этих каналов на уровень АД [40]. Таким образом, антиконстрикторное влияние каналов K_v1 , K_v7 , K_{ir2} и TASK-1 в системных артериях в периоде раннего постнатального онтогенеза выше, чем во взрослом возрасте (рисунок).

Каналы BK_{Ca} демонстрируют противоположные возрастные изменения активности в ГМК системных артерий. Блокада этих каналов не приводила к снижению амплитуды выходящего калиевого тока в ГМК аорты 20-недельных плодов человека, в отличие от ГМК аорты взрослых людей [42]. Сходным образом, различные блокаторы BK_{Ca} каналов обладали менее выраженным влиянием на базальный тонус и на вызванное агонистами сокращение артерий головного мозга, подкожной артерии, сонной артерии и аорты новорожденных крыс и/или овец [38, 41, 43–46]. Содержание порообразующей α_1 - и регуляторной β_1 -субъединицы, оказывающей положительное влияние на активность канала [47], в ткани новорожденных животных было ниже, чем у взрослых [38, 41, 44]. Таким образом, вазомоторная роль каналов BK_{Ca} в системных артериях в период раннего постнатального онтогенеза существенно ниже, чем на более поздних этапах развития (рисунок).

Суммируя представленные выше данные, в системных артериях новорожденных и взрослых животных антиконстрикторное влияние могут опосредовать разные типы K^+ -каналов [48]: функциональная роль каналов K_v1 , K_v7 , K_{ir2} и TASK-1 более значима в период раннего постнатального онтогенеза, а каналов BK_{Ca} – во взрослом возрасте (рисунок). Интересно, что в ГМК легочных артерий картина иная: повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при блокаде каналов K_v более выражено у взрослых овец, а при блокаде каналов BK_{Ca} – у плодов, при этом количество белка и мРНК каналов $K_v2.1$ в легочных артериях овец увеличивается по мере взросления организма, а каналов BK_{Ca} , наоборот, уменьшается [49–51]. Такие особенности функционирования K^+ -каналов могут быть связаны с возрастными особенностями

реагирования артерий малого круга на изменения содержания O_2 : у плодов легочные артерии сокращаются при повышении pO_2 , а у взрослых животных при снижении pO_2 [49–51].

Не все типы K^+ -каналов принимают участие в регуляции тонуса сосудов в нормальных физиологических условиях. Артерии мозга взрослых овец обладают более высокой чувствительностью к активаторам каналов K_{ATP} по сравнению с артериями доношенных плодов [39, 52]. Однако блокада K_{ATP} не изменяет сократительные ответы этих артерий ни у плодов, ни у взрослых животных [38, 39], как и сократительные ответы подкожной артерии 1-2-недельных крысят и взрослых крыс [38, 39]. Это может быть связано с низкой активностью K_{ATP} при достаточном снабжении ГМК кислородом и субстратами метаболизма. Сходным образом блокатор K_v2 каналов не изменял сократительные ответы препаратов подкожной артерии крысят и взрослых крыс [38]. Таким образом, антиконстрикторного влияния K_{ATP} и K_v2 каналов в сосудах большого круга в перинатальный период онтогенеза не было выявлено.

3. Особенности регуляции чувствительности сократительного аппарата к Ca^{2+} в ГМК артерий новорожденного организма

Вклад механизма Ca^{2+} -сенситизации в реализацию сократительного ответа ГМК также изменяется с возрастом: в период раннего постнатального онтогенеза он может быть существенно выше, чем во взрослом организме. Так, сокращение подкожной артерии у 1-недельных крыс реализуется при лишь небольшом повышении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , то есть степень вовлеченности Ca^{2+} -сенситизации в реализацию сократительных ответов в этом возрасте крайне велика [5]. По мере взросления роль Ca^{2+} -сенситизации снижается одновременно с повышением роли Ca^{2+} -зависимых механизмов регуляции сокращения [5]. Сходные данные о высокой Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата ГМК были получены для бедренной, общей сонной и базилярной артерий кроликов в период раннего постнатального онтогенеза [53], а также для артерий головного мозга доношенных плодов овец [54, 55].

Сенситизация сократительного аппарата ГМК к Ca^{2+} обеспечивается функционированием ряда киназ, среди которых наиболее изучены Rho-киназа и протеинкиназа C (PKC) [9, 56]. Основной мишенью действия этих киназ является регуляторная субъединица фосфатазы легких цепей миозина (MYPT1); активация как Rho-киназы, так и PKC приводит к ингибированию активности фосфатазы и, как следствие, блокировке дефосфорилирования регуляторных легких цепей миозина (MLC_{20}), что способствует поддержанию гладкомышечного сокращения.

Еще одной группой киназ, которые могут регулировать чувствительность сократительного аппарата ГМК к Ca^{2+} , являются митоген-активируемые (MAP, Mitogen-Activated Protein) киназы [56]. Было показано, что как содержание на уровне белка, так и функциональный вклад MAP-киназ p42/44 в регуляцию сократительных ответов на серотонин сонной артерии у доношенных плодов овец выше, чем у взрослых особей [57]. Однако в подкожной артерии крысы MAP-киназы p42/44 и p38 не принимают участия в регуляции сократительных ответов на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин в период раннего постнатального онтогенеза, несмотря на многократно увеличенное содержание этих белков в артериях 1–2-недельных крысят по сравнению со взрослыми крысами [5, 58]. Различия в результатах описанных выше работ могут быть связаны с видовыми особенностями животных (овцы или крысы), различиями в исследуемых сосудистых регионах, а также с активацией разных типов рецепторов при стимуляции сокращения ГМК.

Исследование функциональной роли РКС в регуляции тонуса ГМК в период раннего онтогенеза не выявило ее значительного вклада в артериях мозга доношенных плодов овец [59], а также в подкожной артерии крысы в период раннего постнатального онтогенеза [4]. Вместе с тем вклад Rho-киназы в регуляцию сокращения ГМК в период раннего онтогенеза был значительно выше, чем во взрослом возрасте (рисунков). Так, было показано, что у крысят в возрасте 1–2 недели ингибиторы Rho-киназы выраженно уменьшают сократительные ответы системных артерий (на примере подкожной артерии) [4, 60]. Сходные данные были получены и для артерий головного мозга доношенных плодов овец [59]. Более весомый функциональный вклад Rho-киназы в регуляцию тонуса артерий в период раннего постнатального онтогенеза по сравнению со взрослым возрастом коррелирует с большим содержанием белка Rho-киназы [5] и активирующего Rho-киназу белка RhoA [4], а также с более значительным повышением уровней фосфорилирования MYPT1 (по ингибиторному сайту Thr855) и MLC₂₀ (по активационному сайту Ser19) [4].

4. Особенности вазомоторного влияния активных форм кислорода в перинатальном и раннем постнатальном периодах

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что активные формы кислорода (АФК) принимают участие в регуляции тонуса сосудов [61]. АФК способны вызывать как расслабление, так и сокращение ГМК, что зависит от диаметра сосуда, его принадлежности к малому или большому кругу кровообращения, концентрации АФК и места

их продукции в клетке, а также стадии развития организма [62].

Интересно, что в перинатальный период системные сосуды птиц и млекопитающих сокращаются в ответ на гипоксию, а не расслабляются, как это происходит на более поздних этапах развития организма. При этом артериям брыжейки эмбрионов птиц присущ уникальный эндотелий-независимый механизм сокращения в условиях гипоксии, который связан с увеличением продукции АФК митохондриями и NADPH-оксидазами и дальнейшей активацией LTCC и Rho-киназы [63]. У плодов млекопитающих АФК также принимают важное участие в сужении периферических сосудов при гипоксии, что обеспечивает приоритетное кровоснабжение головного мозга («brain-sparing effect»), однако в этом случае констрикторное влияние АФК связано прежде всего со снижением биодоступности эндотелиального NO вследствие повышения продукции АФК в ГМК [64, 65].

Ярким примером важной вазомоторной роли АФК в первые дни постнатального онтогенеза является их участие в сокращении артериального протока (АП). В исследованиях на АП человека и кролика, а также имеющей схожее с АП млекопитающих эмбриональное происхождение легочной части АП куриных эмбрионов нормоксия (21% O_2) приводила к увеличению продукции АФК (преимущественно H_2O_2) митохондриями. Механизм констрикторного влияния H_2O_2 в АП связан с подавлением активности каналов K_v и стимуляцией LTCC, с активацией Rho-киназы и повышением чувствительности сократительного аппарата ГМК к Ca^{2+} , а также с увеличением синтеза церамида, способного активировать NADPH-оксидазы, тем самым еще больше увеличивая продукцию АФК [66–69].

Наконец, АФК обладают выраженным вазомоторным влиянием и на более позднем, но все еще достаточно раннем этапе развития организма. Продукция супероксидного анион-радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$ NADPH-оксидазами в подкожной артерии 10–15-дневных крысят в десятки раз выше, чем в артериях взрослых крыс, что коррелирует с многократным повышением содержания белков NOX2 и NOX4 в ткани артерий крысят [70]. Важно, что такие различия в продукции $\text{O}_2^{\cdot-}$ и содержании белков NOX проявлялись и на функциональном уровне: ингибирование NADPH-оксидаз (преимущественно — NOX2) эндотелий-независимым способом ослабляло сократительные реакции подкожной артерии крысят, но не взрослых крыс [70]. Механизмы констрикторного влияния АФК в артериях развивающегося организма пока не ясны, они могут быть связаны с повышением активности как LTCC [71] и каналов TRP [72], так и Rho-киназы [73, 74].

5. Связь механизмов регуляции дифференцировки и сокращения ГМК в развивающемся сосудистом русле

Как видно из рассмотренных выше данных, в раннем постнатальном онтогенезе для ГМК артерий характерны многочисленные особенности регуляторных механизмов, которые могут приводить как к ослаблению, так и к усилению сократительных ответов. Снижение поступления Ca^{2+} в ГМК через LTCC и усиление гиперполяризующего влияния K^{+} -каналов ($\text{K}_{\text{v}1}$, $\text{K}_{\text{v}7}$, $\text{K}_{\text{ir}2}$ и TASK-1), наряду с антиконстрикторным влиянием NO и низким уровнем нейрогенного тонуса сосудов, должны способствовать расширению системных артерий и снижению уровня АД. Однако такие изменения как повышение деполяризующего влияния CaCC, высокая активность Rho-киназы и констрикторное влияние АФК направлены на повышение тонуса сосудов. Следует отметить, что сужение сосудов необходимо для перераспределения сердечного выброса между органами в зависимости от их потребностей в кровоснабжении, причем в ранний период постнатального развития это не менее важно, чем во взрослом возрасте [75, 76]. В условиях не полностью развитой симпатической иннервации сосудов взаимодействие описанных выше констрикторных и антиконстрикторных механизмов обеспечивает баланс регуляции сосудистого тонуса, оптимальный для незрелой сердечно-сосудистой системы.

Важно, что при развитии сосудистой системы многие вазомоторные механизмы вовлечены в регуляцию дифференцировки и созревания ГМК. У крыс в возрасте 1–2 недели ГМК артерий еще не полностью дифференцированы в сократительный фенотип, в них значительно снижено содержание α -актина и тяжелой цепи гладкомышечного миозина [77, 78], а также киназы и фосфатазы легких цепей миозина, участвующих в Ca^{2+} -зависимой регуляции сокращения [5, 78]. Удельная сила сокращения гладкомышечного слоя стенки артерий (media stress) у 1-2-недельных крысят почти вдвое меньше, чем во взрослом возрасте [5].

Влияние на развитие сосудистой системы наиболее изучено для сигнальных путей Rho-

киназы и АФК. Интересно, что на этапе формирования сосудистой сети эти сигнальные пути усиливают пролиферацию ГМК, что связано с активацией каскада MAP-киназ (Mitogen-Activated Protein Kinase) p42/44 однако на более поздних этапах они переключаются на регуляцию дифференцировки ГМК в сократительный фенотип, при этом их основной мишенью становится транскрипционный фактор миокардин [79–81]. Содержание в ГМК α -актина и гладкомышечного миозина прямо коррелирует с содержанием белка RhoA и активностью Rho-киназы [81–83]. АФК в относительно низких физиологических концентрациях также стимулируют синтез гладкомышечных белков [84, 85].

Дифференцировку ГМК сосудов также регулируют трофические влияния со стороны эндотелия и созревающих симпатических нервов, причем действие этих механизмов может относиться к разным этапам онтогенеза. Действие NO проявляется раньше: у крыс – еще в пренатальном онтогенезе. Так, снижение продукции NO в организме самок во второй половине беременности сопровождается замедлением дифференцировки ГМК в аорте новорожденных крысят [86]. Влияние NO на дифференцировку ГМК может быть связано с повышением активности сигнального пути Rho-киназы [87, 88]. Трофическое влияние симпатических нервов реализуется позже, в раннем постнатальном онтогенезе [5, 78]. Оно связано, напротив, со снижением активности Rho-киназы и механизма Ca^{2+} -сенситизации и повышением вклада Ca^{2+} -зависимых механизмов в регуляцию сокращения ГМК [4, 5]. В целом, для ответа на важный вопрос о взаимодействии различных механизмов, регулирующих дифференцировку ГМК, особенно в условиях *in vivo*, нужны дальнейшие исследования.

Обзор написан в рамках выполнения Научного проекта государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М.В. Ломоносова № 121032300071-8. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kent A.L., Kecskes Z., Shadbolt B., Falk M.C. Normative blood pressure data in the early neonatal period. *Pediatr Nephrol.* 2007;22(9):1335–1341.
2. Noori S., Drabu B., Soleymani S., Seri I. Continuous non-invasive cardiac output measurements in the neonate by electrical velocimetry: A comparison with echocardiography. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 2012;97(5):340–344.

3. Stulcová B. Postnatal development of cardiac output distribution measured by radioactive microspheres in rats. *Biol. Neonate.* 1977;32(3–4):119–124.
4. Mochalov S. V., Tarasova N. V., Kudryashova T.V., Gaynullina D.K., Kalenchuk V.U., Borovik A.S., Vorotnikov A.V., Tarasova O.S., Schubert R. Higher Ca^{2+} -sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity. *Acta Physiol.* 2018;223(3):e13044.

5. Puzdrova V.A., Kudryashova T. V., Gaynullina D.K., Mochalov S. V., Aalkjaer C., Nilsson H., Vorotnikov A.V., Schubert R., Tarasova O.S. Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca^{2+} sensitivity during early post-natal development in rats. *Acta Physiol.* 2014;212(2):128–141.
6. Sofronova S.I., Borzykh A.A., Gaynullina D.K., Kuzmin I. V., Shvetsova A.A., Lukoshkova E.V., Tarasova O.S. Endothelial nitric oxide weakens arterial contractile responses and reduces blood pressure during early postnatal development in rats. *Nitric Oxide.* 2016;55–56:1–9.
7. Gaynullina D., Lubomirov L.T., Sofronova S.I., Kalenchuk V.U., Gloe T., Pfitzer G., Tarasova O.S., Schubert R. Functional remodelling of arterial endothelium during early postnatal development in rats. *Cardiovasc. Res.* 2013;99(4):612–621.
8. Gaynullina D.K., Schubert R., Tarasova O.S. Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis—a key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(6):1421.
9. Somlyo A.P., Somlyo A.V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 2003;83(4):1325–1358.
10. Dimopoulos G.J., Semba S., Kitazawa K., Eto M., Kitazawa T. Ca^{2+} -dependent rapid Ca^{2+} sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circ. Res.* 2007;100(1):121–129.
11. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr. Physiol.* 2017;7(2):485–581.
12. Kitazawa T., Kitazawa K. Size-dependent heterogeneity of contractile Ca^{2+} sensitization in rat arterial smooth muscle. *J. Physiol.* 2012;590(2):5401–5423.
13. Hansen P.B.L. New role of P/Q-type voltage-gated calcium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2015;65(5):406–411.
14. Gollasch M., Haase H., Ried C., Lindschau C., Morano I., Luft F.C., Haller H. L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 1998;12(7):593–601.
15. Quignard J.F., Grazzini E., Guillon G., Harriane M.C., Nargeot J., Richard S. Absence of calcium channels in neonatal rat aortic myocytes. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 1996;431(5):791–793.
16. Nakanishi T., Gu H., Abe K., Momma K. Developmental changes in the contractile system of the mesenteric small artery of rabbit. *Pediatr. Res.* 1997;41(1):65–71.
17. Lozinskaya I.M., Cox R.H. Effects of age on Ca^{2+} currents in small mesenteric artery myocytes from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertens.* 1997;29(6):1329–1336.
18. Blood A.B., Zhao Y., Long W., Zhang L., Longo L.D. L-type Ca^{2+} channels in fetal and adult ovine cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002;282(1):51–51.
19. Ahmed A., Waters C.M., Leffler C.W., Jaggar J.H. Ionic mechanisms mediating the myogenic response in newborn porcine cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004;287 (5):H2061–H2069.
20. Long W., Zhao Y., Zhang L., Longo L.D. Role of Ca^{2+} channels in NE-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and tension in fetal and adult cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1999;277(1):R286–R294.
21. Cogolludo A., Moreno L., Lodi F., Tamargo J., Perez-Vizcaino F. Postnatal maturational shift from PKC ζ and voltage-gated K^+ channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc. Res.* 2005;66(1):84–93.
22. Shen C.P., Romero M., Brunelle A., Wolfe C., Dobyns A., Francis M., Taylor M.S., Puglisi J.L., Loggo L.D., Zhang L., Wilson C.G., Wilson S.M. Long-term high-altitude hypoxia influences pulmonary arterial L-type calcium channel-mediated Ca^{2+} signals and contraction in fetal and adult sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2018;314(3):R433–R446.
23. Ricci A., Bronzetti E., El-Assouad D., Felici L., Greco S., Mariotta S., Sabbatini M., Amenta F. Influence of age on L-type Ca^{2+} channels in the pulmonary artery and vein of spontaneously hypertensive rats. *Mech. Ageing Dev.* 2000;120(1–3):33–44.
24. House S.J., Potier M., Bisailon J., Singer H.A., Trebak M. The non-excitabile smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2008;456(5):769–785.
25. Soni H., Peixoto-Neves D., Buddington R.K., Adebisi A. Adenosine A1 receptor-operated calcium entry in renal afferent arterioles is dependent on postnatal maturation of TRPC3 channels. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2017;313(6):F1216–F1222.
26. Chipperfield A.R., Harper A.A. Chloride in smooth muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2000;74(3–5):175–221.
27. Hübner C.A., Schroeder B.C., Ehmke H. Regulation of vascular tone and arterial blood pressure: role of chloride transport in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2015;467(3):605–614.
28. Nilsson H., Videbæk L.M., Toma C., Mulvany M.J. Role of intracellular calcium for depolarization in rat mesenteric small arteries. *J. Vasc. Res.* 1998;35:36–44.
29. Boedtker D.M.B., Kim S., Jensen A.B., Matchkov V.M., Andersson K.E. New selective inhibitors of calcium-activated chloride channels – T16Ainh-A01, CaCinh-A01 and MONNA – what do they inhibit? *Br. J. Pharmacol.* 2015;172(16):4158–4171.
30. Nelson M.T., Conway M.A., Knot H.J., Brayden J.E. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J. Physiol.* 1997;502(2):259–264.
31. Lamb F.S., Barna T.J. Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1998;275(1):151–160.
32. Kostyunina D.S., Zhang L., Shvetsova A.A., Selivanova E.K., Tarasova O.S., Matchkov V.V., Gaynullina D.K. Trophic sympathetic influence weakens pro-contractile role of Cl^- channels in rat arteries during postnatal maturation. *Sci. Rep.* 2020;10(1):20002.
33. Heinze C., Seniuk A., Sokolov M.V., Huebner A.K., Klementowicz A.E., Szijártó I.A., Schleifenbaum J., Vitzthum H., Gollasch M., Ehmke H., Schroeder B.C., Hübner C.A. Disruption of vascular Ca^{2+} -activated chloride currents lowers blood pressure. *J. Clin. Invest.* 2014;124(2):675–686.
34. Jensen A.B., Joergensen H.B., Dam V.S., Kamaev D., Boedtker D., Füchtbauer E.-M., Aalkjaer C., Matchkov V.V. Variable contribution of TMEM16A to tone in murine arterial vasculature. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2018;123(1):30–41.

35. Broegger T., Jacobsen J.C.B., Secher Dam V., Boedtkjer D.M.B., Kold-Petersen H., Pedersen F.S., Pedersen F.S., Aalkjaer C., Matchkov V.V. Bestrophin is important for the rhythmic but not the tonic contraction in rat mesenteric small arteries. *Cardiovasc. Res.* 2011;91(4):685–693.
36. Kostyunina D.S., Tarasova O.S., Gaynullina D.K., Matchkov V.V. Pro-contractile role of chloride in arterial smooth muscle: Postnatal decline potentially governed by sympathetic nerves. *Exp. Physiol.* 2019;104(7):1018–1022.
37. Belevych A.E., Beck R., Tammaro P., Poston L., Smirnov S.V. Developmental changes in the functional characteristics and expression of voltage-gated K⁺ channel currents in rat aortic myocytes. *Cardiovasc. Res.* 2002;54(1):152–161.
38. Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Schubert R. Negative feedback regulation of vasocontraction by potassium channels in 10- to 15-day-old rats: Dominating role of K_v7 channels. *Acta Physiol.* 2019;225(2):e13176.
39. Long W., Zhang L., Longo L.D. Cerebral artery K_{ATP}⁻ and K_{Ca}⁻ channel activity and contractility: changes with development. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2000;279(6):R2004–R2014.
40. Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Schmidt N., Bugert P., Lukoshkova E. V., Tarasova O.S., Schubert R. TASK-1 channel blockade by AVE1231 increases vasocontractile responses and BP in 1- to 2-week-old but not adult rats. *Br. J. Pharmacol.* 2020;177(22):5148–5162.
41. Gomez J.P., Ghisdal P., Morel N. Changes of the potassium currents in rat aortic smooth muscle cells during postnatal development. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2000;441(2–3):388–397.
42. Bregestovski P.D., Printseva O.Yu., Serebryakov V., Stinnakre J., Turmin A., Zamoyski V. Comparison of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in the membrane of smooth muscle cells isolated from adult and foetal human aorta. *Pflugers Arch.* 1988;413(1):8–13.
43. Gollasch M., Wellman G.C., Knot H.J., Jaggar J.H., Damon D.H., Bonev A.D., Nelson M.T. Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ signals in cerebral arteries: Ca²⁺ sparks as elementary physiological events. *Circ. Res.* 1998;83(11):1104–1114.
44. Ma D., Gaynullina D., Schmidt N., Mladenov M., Schubert R. The functional availability of arterial K_v7 channels is suppressed considerably by large-conductance calcium-activated potassium channels in 2- to 3-month old but not in 10- to 15-day old rats. *Front. Physiol.* 2020;11:597395.
45. Teng G.Q., Nauli S.M., Brayden J.E., Pearce W.J. Maturation alters the contribution of potassium channels to resting and 5HT-induced tone in small cerebral arteries of the sheep. *Dev. Brain Res.* 2002;133(2):81–91.
46. Thorpe R.B., Stockman S.L., Williams J.M., Lincoln T.M., Pearce W.J. Hypoxic depression of PKG-mediated inhibition of serotonergic contraction in ovine carotid arteries. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013;304(9):R734–R743.
47. Bao L., Cox D.H. Gating and ionic currents reveal how the BKCa channel's Ca²⁺ sensitivity is enhanced by its β 1 subunit. *J. Gen. Physiol.* 2005;126(4):393–412.
48. Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Schubert R. Remodeling of arterial tone regulation in postnatal development: Focus on smooth muscle cell potassium channels. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(11):5413.
49. Rhodes M.T., Porter V.A., Saqueton C.B., Herron J.M., Resnik E.R., Cornfield D.N. Pulmonary vascular response to normoxia and K_{Ca} channel activity is developmentally regulated. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2001;280(6):L1250–L1257.
50. Cornfield D.N., Saqueton C.B., Porter V.A., Herron J., Resnik E., Haddad I.Y., Reeve H.L. Voltage-gated K(+) channel activity in ovine pulmonary vasculature is developmentally regulated. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000;278(6):L1297–L1304.
51. Reeve H.L., Weir E.K., Archer S.L., Cornfield D.N. A maturational shift in pulmonary K⁺ channels, from Ca²⁺ sensitive to voltage dependent. *Am. J. Physiol.* 1998;275(96):L1019–L1025.
52. Pearce W.J., Elliott S.R. Maturation enhances the sensitivity of ovine cerebral arteries to the ATP-sensitive potassium channel activator lemakalim. *Pediatr. Res.* 1994;35(6):729–732.
53. Akopov S.E., Zhang L., Pearce W.J. Developmental changes in the calcium sensitivity of rabbit cranial arteries. *Biol. Neonate.* 1998;74(1):60–71.
54. Akopov S.E., Zhang L., Pearce W.J. Physiological variations in ovine cerebrovascular calcium sensitivity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1997;272(5):41–45.
55. Sandoval R.J., Injeti E.R., Williams J.M., Georhoffer W.T., Pearce W.J. Myogenic contractility is more dependent on myofilament calcium sensitization in term fetal than adult ovine cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;293(1):H548–H556.
56. Воротников А.В., Щербакова О.В., Кудряшова Т.В., Тарасова О.С., Ширинский В.П., Пфитцер Г., Ткачук В.А. Фосфорилирование миозина как основной путь регуляции сокращения гладких мышц. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2009;95(10):1058–1073.
57. Pearce W.J., Williams J.M., Chang M.M., Gerthoffer W.T. ERK inhibition attenuates 5-HT-induced contractions in fetal and adult ovine carotid arteries. *Arch. Physiol. Biochem.* 2003;111(1):36–44.
58. Gaynullina D.K., Kudryashova T.V., Vorotnikov A.V., Schubert R., Tarasova O.S. MAPKs are highly abundant but do not contribute to α 1-adrenergic contraction of rat saphenous arteries in the early postnatal period. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(11):6037.
59. Akopov S.E., Zhang L., Pearce W.J. Regulation of Ca²⁺ sensitization by PKC and rho proteins in ovine cerebral arteries: Effects of artery size and age. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1998;275(3):930–939.
60. Mochalov S.V., Kalenchuk V.U., Gaynullina D.K., Vorotnikov A.V., Tarasova O.S. The contribution of protein kinase C and Rho-kinase to the regulation of receptor-dependent contraction of arteries decreases with age independently of sympathetic innervation. *Biophysics (Mosc.).* 2008;53(6):626–631.
61. Knock G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* 2019;145:385–427.
62. Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Tarasova O.S. The role of reactive oxygen species in the regulation of blood vessel tone in perinatal and early postnatal ontogenesis. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.* 2023;59(6):2210–2227.

63. Brinks L., Moonen R.M.J., Moral-Sanz J., Barreira B., Kessels L., Perez-Vizcaino F., Collogudo A., Villamor E. Hypoxia-induced contraction of chicken embryo mesenteric arteries: Mechanisms and developmental changes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2016;311(5):R858–R869.
64. Thakor A.S., Richter H.G., Kane A.D., Dunster C., Kelly F.J., Poston L., Giussani D.A. Redox modulation of the fetal cardiovascular defence to hypoxaemia. *J. Physiol.* 2010;588(21):4235–4247.
65. Kane A.D., Hansell J.A., Herrera E.A., Allison B.J., Niu Y., Brain K.L., Kaandorp J.J., Derks J.B., Giussani D.A. Xanthine oxidase and the fetal cardiovascular defence to hypoxia in late gestation ovine pregnancy. *J. Physiol.* 2014;592(3):475–489.
66. Michelakis E.D., Rebeyka I., Wu X.C., Nsair A., Thébaud B., Hashimoto K., Dyck J.R., Haromy A., Harry G., Barr A., Archer S.L. O₂ sensing in the human ductus arteriosus: Regulation of voltage-gated K⁺ channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. *Circ. Res.* 2002;91(6):478–486.
67. Cogolludo A.L., Moral-Sanz J., Van Der Sterren S., Frazziano G., Van Cleef A.N.H. Maturation of O₂ sensing and signaling in the chicken ductus arteriosus. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2009;297(4):619–630.
68. Reeve H.L., Tolarova S., Nelson D.P., Archer S., Kenneth Weir E. Redox control of oxygen sensing in the rabbit ductus arteriosus. *J. Physiol.* 2001;533(1):253–261.
69. Kajimoto H., Hashimoto K., Bonnet S.N., Haromy A., Harry G., Moudgil R., Nakanishi T., Rebeyka I., Thébaud B., Michelakis E.D., Archer S.I. Oxygen activates the Rho/Rho-kinase pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species: A newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction. *Circulation.* 2007;115(13):1777–1788.
70. Shvetsova A.A., Khlystova M.A., Makukha Y.A., Shateeva V.S., Borzykh A.A., Gaynullina D.K., Tarasova O.S. Reactive oxygen species augment contractile responses of saphenous artery in 10-15-day-old but not adult rats: Substantial role of NADPH oxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 2024;216:24–32.
71. Vogel P.A., Yang X., Moss N.G., Arendshorst W.J. Superoxide enhances Ca²⁺ entry through L-type channels in the renal afferent arteriole. *Hypertension.* 2015;66(2):374–381.
72. Ding Y., Winters A., Ding M., Graham S., Akopova I., Muallem S., Wang Y., Hee Hong J., Gryczynski Z., Yang S.-H., Birnbaumer L., Ma R. Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone. *J. Biol. Chem.* 2011;286(36):31799–31809.
73. Snetkov V.A., Smirnov S.V., Kua J., Aaronson P.I., Ward J.P., Knock G.A. Superoxide differentially controls pulmonary and systemic vascular tone through multiple signalling pathways. *Cardiovasc. Res.* 2011;89(1):214–224.
74. Knock G.A., Snetkov V.A., Shaifta Y., Aaronson P.I., Ward J.P.T., Knock G.A. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization. *Free Radic. Biol. Med.* 2009;46(5):633–642.
75. Bruckner M., Binder-Heschl C., Schwaberg B., Mileder L.P., Baik-Schneditz N., Koestenberger M., Avian A., Urlesberger B., Pichler G. Cerebral and peripheral tissue oxygenation in stable neonates: Absent influence of cardiac function. *Acta Paediatr.* 2020;109(8):1560–1569.
76. Rudolph A.M. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ. Res.* 1985;57(6):811–821.
77. Charles S.M., Zhang L., Cipolla M.J., Buchholz J.N., Pearce W.J. Roles of cytosolic Ca²⁺ concentration and myofilament Ca²⁺ sensitization in age-dependent cerebrovascular myogenic tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010;299(4):H1034–H1044.
78. Reho J.J., Zheng X., Benjamin J.E., Fisher S.A. Neural programming of mesenteric and renal arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014;307(4):H563–H573.
79. Badran A., Nasser S.A., Mesmar J., El-Yazbi A.F., Bitto A., Fardoun M.M., Baydoun E., Eid A.H. Reactive oxygen species: Modulators of phenotypic switch of vascular smooth muscle cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(22):8764.
80. Sawma T., Shaito A., Najm N., Sidani M., Orekhov A., El-Yazbi A.F., Iratni R., Eid A.H. Role of RhoA and Rho-associated kinase in phenotypic switching of vascular smooth muscle cells: Implications for vascular function. *Atherosclerosis.* 2022;358:12–28.
81. Wamhoff B.R., Bowles D.K., McDonald O.G., Sinha S., Somlyo A.P., Somlyo A.V., Owens G.K. L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a Rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circ. Res.* 2004;95(4):406–414.
82. Hellstrand P., Albinsson S. Stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle: role of the actin cytoskeleton. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005;83(10):869–875.
83. Mack C.P., Somlyo A.V., Hautmann M., Somlyo A.P., Owens G.K. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 2001;276(1):341–347.
84. Clempus R.E., Sorescu D., Dikalova A.E., Pounkova L., Jo P., Sorescu G.P., Schmidt H.H.H., Lassègue B., Griendling K.K. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27(1):42–48.
85. Xiao Q., Luo Z., Pepe A.E., Margariti A., Zeng L., Xu Q. Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H₂O₂. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009;296(4):711–723.
86. Shvetsova A.A., Borzykh A.A., Selivanova E.K., Kiryukhina O.O., Gaynullina D.K., Tarasova O.S. Intrauterine nitric oxide deficiency weakens differentiation of vascular smooth muscle in newborn rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(15):8003.
87. Sauzeau V., Rolli-Derkinderen M., Marionneau C., Loirand G., Pacaud P. RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 2003;278(11):9472–9480.
88. Pilz R.B., Casteel D.E. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ. Res.* 2003;93(11):1034–1046.

Поступила в редакцию 22.04.2024

После доработки 10.06.2024

Принята в печать 20.06.2024

REVIEW

Regulation of vascular smooth muscle cell contraction during early postnatal ontogenesis

D.K. Gaynullina¹ , O.S. Tarasova^{1,2,*} , A.A. Shvetsova¹ 

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

²*Department of Physiology and Pathology, School of Basic Medicine, Lomonosovsky pr. 27–1, Moscow, 119991, Russia*

**e-mail: tarasovaos@my.msu.ru*

Growth of the body in early postnatal ontogenesis is associated with changes in the functioning of many organ systems, including the cardiovascular system. The circulatory system of newborns is characterized by numerous structural and functional features, which at the systemic level is manifested in a significantly lower level of blood pressure. This review describes the differences in the mechanisms of regulation of vascular smooth muscle cell contraction in early postnatal ontogenesis and in adulthood, including age-related changes in the functioning of ion channels, which activity affects membrane potential level and intracellular concentration of calcium ions, as well as changes in calcium sensitivity of the contractile apparatus. The final section of the review discusses the connection between the mechanisms regulating contraction and differentiation of vascular smooth muscle cells during maturation.

Keywords: *vascular tone, ion channels, calcium sensitivity of the contractile apparatus, reactive oxygen species, differentiation*

Funding: The research was supported by the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No. 121032300071-8.

Сведения об авторах

Гайнуллина Дина Камилевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: dina.gaynullina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5104-2399>

Тарасова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц., проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; зав. кафедрой физиологии и патологии факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: tarasovaos@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-3849>

Швецова Анастасия Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8859-7689>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 591.112.1+612.179.1

Посвящается академику Тиграну Мелькумовичу Турпаеву

Роль NAADP в поддержании спонтанных сокращений сердца: сравнительно-физиологические исследования

Е.С. Кузьмина¹, М.В. Нечаева^{1, 2} , П.В. Авдонин^{1, *} ¹Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;²Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова, Российская академия наук, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр., д. 33

*e-mail: pavel.avdonin@idbras.ru

Целью работы было изучение роли вторичного мессенджера NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate), вызывающего высвобождение ионов Ca^{2+} из лизосом и эндосом, в поддержании спонтанных сокращений сердца. В качестве объектов использовали изолированные сердца виноградной улитки *Helix pomatia* и куриного зародыша на донервной стадии эмбрионального развития. Используя проникающий через мембрану ацетооксиметильный эфир NAADP-AM, мы показали, что NAADP в наномолярных концентрациях увеличивает частоту и амплитуду спонтанных сокращений сердца *H. pomatia*. Антагонист NAADP NED19, не влияя на амплитуду сокращений, дозозависимо снижает их частоту, полностью блокируя спонтанные сокращения сердца моллюска при концентрации 5 мкМ. Ингибитор H^+ -АТФазы V-типа бафиломицин А1 подавляет накопление ионов кальция в лизосомах и кислых эндосомах. Мы показали, что бафиломицин А1 вызывает затухание спонтанных сокращений и остановку сердца *H. pomatia*. Серотонин увеличивает амплитуду сокращений сердца *H. pomatia*, не влияя на частоту сокращений. NED19 в насыщающих концентрациях (10 мкМ) снижает частоту сокращений при активации сердца улитки серотином, но лишь частично уменьшает их амплитуду. В экспериментах с изолированным сердцем куриного зародыша нами показано, что NED19 снижает частоту спонтанных сокращений, не влияя на амплитуду сокращений. На основании полученных данных высказана гипотеза, согласно которой высвобождение под влиянием эндогенного NAADP ионов кальция из лизосом и эндосом способствует поддержанию спонтанной сократимости сердца.

Ключевые слова: кальций, сокращение сердца, NAADP, *H. pomatia*, куриный зародыш

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-6

Введение

Повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) является триггером сокращения сердечной мышцы. Ионы кальция поступают в цитоплазму кардиомиоцитов из саркоплазматического ретикулума (СР) через рианодин-чувствительные каналы типа RyR2, открывающиеся после деполяризации плазматической мембраны. Через каналы RyR2 происходит кальций-индуцированное высвобождение кальция (CICR, Calcium-Induced Calcium Release), которое потенцируется циклической АДФ-рибозой (сADPR, Cyclic Adenosine Diphosphoribose) [1]. Вклад в выброс ионов кальция из СР вносят также чувствительные к инозитол-1,4,5-трисфосфату (InsP_3 , Inositol Trisphosphate) каналы. В сердце

млекопитающих образование InsP_3 стимулируют норадреналин, эндотелин-1, ангиотензин II и некоторые другие гормоны и нейротрансмиттеры [2, 3]. Еще одним внутриклеточным агентом, вызывающим высвобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо в широком спектре систем от растений до клеток млекопитающих, является адениндинуклеотидфосфат никотиновой кислоты (NAADP — Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate) [4]. NAADP-индуцированная мобилизация Ca^{2+} впервые была обнаружена в гомогенатах яиц морских ежей [5]. С того времени было показано, что данный механизм регуляции $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ является универсальным — он есть в клетках разных организмов, принадлежащих к Deuterostomia и Protostomia [6]. NAADP активирует двупоровые

Ca^{2+} -проницаемые каналы (TPC, Two-Pore Channels), расположенные в мембране кислых эндосом и лизосом [7–9]. Чувствительность каналов TPC к NAADP очень высока, его влияние на мобилизацию Ca^{2+} проявляется, начиная с субнанолярных концентраций [10].

Опубликовано немало статей, посвященных NAADP-зависимой регуляции $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в сердце [11]. Объектами исследования были изолированные кардиомиоциты [12–14]. Но в то же время есть совсем немного информации о роли данного механизма в реализации физиологических функций сердца. Установлено, что в сердцах, взятых у мышей $\text{Trpcn2}^{-/-}$, не экспрессирующих активируемые NAADP кальциевые каналы TPC2, снижен инотропный эффект изопротеренола [15]. Целью данной работы было определить, каким образом NAADP влияет на частоту и силу сокращений целого сердца.

В первую очередь нас интересовало влияние NAADP на сердце в отсутствие воздействия нейроэндокринных факторов. В качестве объектов были выбраны изолированное сердце виноградной улитки *Helix pomatia* и сердце куриного зародыша, взятое на ранней стадии эмбрионального развития, когда оно не имеет иннервации и кровообращения. Каждый из этих объектов обладает спонтанной сократительной активностью. Эти уникальные модели для проведения физиологических исследований были разработаны под руководством академика Тиграна Мелькумовича Турпаева [16, 17]. Представленные в данной статье результаты были частично доложены нами ранее [18, 19].

Материалы и методы

Реактивы. NAADP-AM, проникающий в клетку в форме NAADP [17], был получен от компании Technology Transfer Company (Оксфордский университет, Великобритания), NED19 (транс-изомер) и бафиломицин A1 от Tocris bioscience, 5-HT от SigmaAldrich (США). NAADP-AM был растворен в диметилсульфоксиде (ДМСО) до концентрации 1 мМ, концентрации NED19 и бафиломицин A1 в ДМСО составляли 10 мМ. Непосредственно перед использованием эти соединения растворяли в растворе Рингера (РР). РР имел следующий состав, мМ: NaCl – 110; KCl – 2,0; NaHCO_3 – 2,4; CaCl_2 – 0,9. В контрольных экспериментах вместо NAADP-AM, NED19 и бафиломицина A1 в РР добавляли ДМСО до соответствующих конечных концентраций (от 0,01 до 0,2%). В таких концентрациях ДМСО не оказывал влияния на сократимость сердца *H. pomatia* и куриного эмбриона.

Регистрация сокращений изолированного сердца *H. pomatia*. Для экспериментов использовали крупных виноградных улиток *H. pomatia* (размер раковины 35–45 мм). Выделение сердца и реги-

страцию сокращений проводили по методу, описанному ранее [20]. Моллюска обезглавливали, раскалывали раковину, вскрывали полость тела и извлекали сердце. Тонкий конец стеклянной канюли, наполненной РР, вводили в сердце со стороны предсердия. Добавление исследуемых веществ в полость сердца *H. pomatia* проводили путем смены содержимого канюли. Объем добавляемого через канюлю раствора указан в подписях к рисункам. Измерения амплитуды и частоты сердца *H. pomatia* проводили в изотоническом режиме при 20–21°C. Сердце фиксировали на канюле со стороны предсердия и прикрепляли со стороны желудочка тонкой нитью к плечу механического датчика 6MX1B (Россия). Смещения, вызванные сокращениями сердца, преобразовывались в электрические сигналы и регистрировались с помощью одноканального устройства W+W Recorder (Kontron AG, Швейцария). Данные на рисунках репрезентативны для трех или более экспериментов.

Регистрация сокращений изолированного сердца куриного зародыша. Эксперименты проводили на оплодотворенных яйцах породы Белый Леггорн (White Leghorn), инкубируемых в лабораторном инкубаторе при оптимальных условиях ($37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и влажности 60–70%) до 4 сут. Зародыш изолировали из яйца и помещали в чашку Петри с раствором Хэнкса, сердце вырезали, сохраняя желудочек, предсердие и выносящий тракт, затем промывали и помещали в чашку Петри с раствором Хэнкса при температуре $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Частоту спонтанных сокращений сердца (ЧСС) определяли на основе анализа файлов видеорегистрации. Для этого использовали микроскоп (OPTIKA SZM-2Led, Италия), оснащенный цифровой видеокамерой DMK 23UV024 (The Imaging Source, Германия). Видеорегистрацию осуществляли со скоростью 25 или 30 кадров в секунду. Полученные данные анализировали с использованием программы DanioScore (Noldus, Нидерланды). Детали метода регистрации спонтанных сокращений сердца были описаны ранее [21].

Статистическая обработка данных. Достоверность различий между двумя группами наблюдений определяли с помощью критерия Уилкоксона и одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты

Исследование влияния NAADP на сократимость изолированного сердца *H. pomatia*. Для изучения влияния NAADP на сократительные свойства сердца *H. pomatia* нами был использован его ацетоксиметильный эфир NAADP (NAADP-AM), который проникает через клеточные мембраны и гидролизруется цитоплазматической эстеразой до свободного NAADP. Из-за небольшой толщины стенок сердца виноградной улитки NAADP-AM

может диффундировать по всей глубине ткани миокарда. В представленном на рис. 1 эксперименте нами сначала проводилась запись спонтанных сокращений с РР в канюле, затем содержимое канюли отсасывали и в нее вносили РР, содержащий 200 нМ NAADP-AM. После 6 мин регистрации сокращений содержимое канюли заменяли на свежий раствор с NAADP-AM. Как показано на рис. 1А последовательное добавление NAADP-AM приводило к постепенному увеличению частоты и амплитуды сокращений сердца.

На рис. 1 Б продемонстрированы изменения частоты сердечных сокращений (ЧСС) после нескольких добавлений NAADP-AM. Среднее значение ЧСС после шестой добавки NAADP-AM возросло на $79,8 \pm 12,6\%$ ($N=3$; $\text{Mean} \pm \text{SE}$; $p < 0,01$) по сравнению с исходной частотой. Примечательно, что длительное воздействие NAADP на сердце улитки приводило не только к увеличению частоты сокращений, но и к нарушениям ритма сердечных сокращений. Как видно на рис. 1А (вставки), после четвертого добавления NAADP-AM появлялись парные сокращения с разной амплитудой. Амплитуда сокращений к этому моменту возрастала более, чем на 75% по сравнению с исходной до добавления NAADP-AM. Позже сердце начинало совершать пачечные четверные сокращения с небольшой паузой между ними. Ранее было показано, что на фоне сильной β -адренергической стимуляции инъекция NAADP в кардиомиоциты мыши, которые электростимулировали, вызывает в них кратковременные подъемы $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ во время диастолы [14]. В этой же работе показано, что антагонист NAADP BZ194 устранял аритмию, вызванную введением изопроterenолом бодрствующим мышам. В наших экспериментах, проведенных в изолированном сердце *H. pomatia*, впервые показано, что NAADP ускоряет ритм спонтанных сокращений и при избыточном воздействии непосредственно сам без гормонального воздействия может вызывать аритмию. Конкурентным блокаторм участков связывания NAADP является его структурный аналог NED19. Введение его в канюлю вместе с NAADP-AM приводило к затуханию сокращений и остановке сердца (рис. 1А). При последующем отмывании содержимого полости сердца от NED19 и NAADP-AM ритм и амплитуда сокращений восстанавливались до исходного контрольного уровня.

Мы показали, что NAADP не только увеличивает частоту и амплитуду сокращений сердца *H. pomatia*, но также способен предотвращать его остановку. Для демонстрации этого были подобраны такие условия эксперимента, при которых спонтанные сокращения сердца самопроизвольно замедляются и сердце останавливается. Это было достигнуто путем уменьшения объема, добавляемого в канюлю РР. Для того, чтобы сердце *H. pomatia* могло спонтанно сокращаться продол-

жительное время, объем РР в канюле должен быть достаточно большим, что, по-видимому, необходимо для поддержания определенного давления на стенки сердца. В эксперименте, представленном на рис. 1, в канюлю добавляли 200 мкл РР. Уменьшение объема РР в канюле до 100 мкл приводило к тому, что сокращения постепенно затухали и сердце останавливалось (рис. 2). Смена РР в канюле вызывала активацию сердечных сокращений, но после этого вновь происходило замедление ритма сокращений и остановка сердца. Однако если в РР был добавлен NAADP-AM в концентрации 100 нМ, ритм сокращений восстанавливался и сердце не останавливалось.

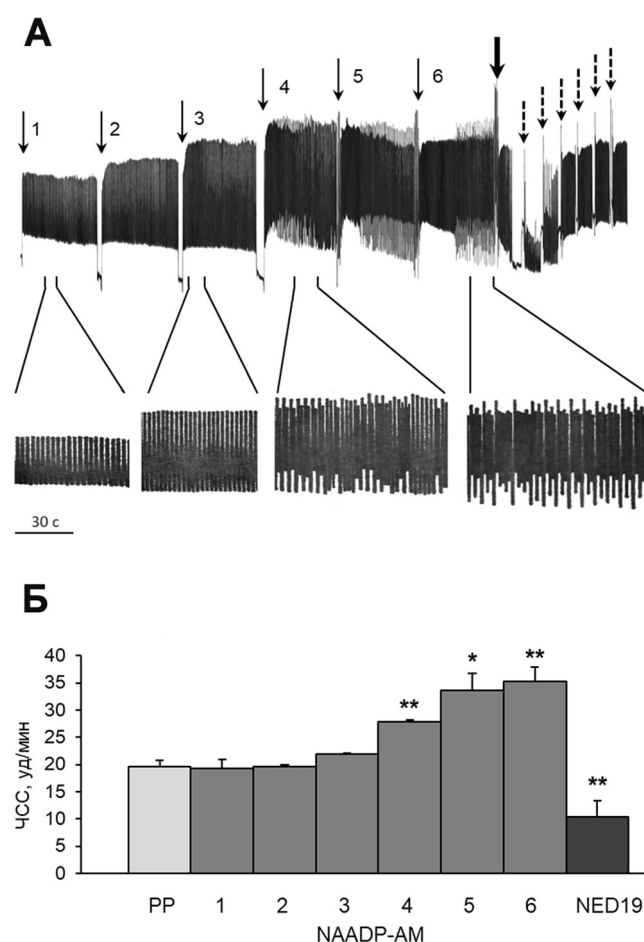


Рис. 1. Влияние NAADP-AM и NED19 на сократимость сердца *H. pomatia*.

А — Диаграмма сокращений сердца при последовательной смене раствора в канюле. Добавление в канюлю раствора Рингера (РР) с 200 нМ NAADP-AM обозначено тонкими стрелками и цифрами, добавление 200 нМ NAADP-AM и 10 мМ NED19 толстой стрелкой и добавление РР прерывистыми стрелками. Объем добавляемого раствора в канюлю составлял 200 мкл. В контроле РР содержал ДМСО в концентрации, соответствующей концентрации, вносимой вместе с NAADP-AM.

Б — Изменение частоты сокращений при действии NAADP-AM и NED19. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n=3$; отличия от контроля значимы: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$). Достоверность изменений ЧСС при последовательных добавлениях NAADP-AM оценивали с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA).

Мы исследовали, каково влияние NED19 на спонтанные сокращения сердца в отсутствие NAADP-AM (рис. 3А). Целью этих экспериментов было выяснить, участвует ли эндогенный NAADP в поддержании сокращений сердца *H. pomatia*. На рис. 3А показано влияние NED19 на спонтанные сокращения сердца в отсутствие NAADP-AM. NED19, начиная с концентрации 1 мкМ, вызывал замедление ритма спонтанных сокращений сердца улитки. При концентрации 2,5 мкМ его ингибирующий эффект был более выражен, а при 5 и 10 мкМ NED19 сокращения полностью блокировались. Эффект NED19 был обратимым. После отмывания сердца значения частоты и амплитуды спонтанных сокращений быстро восстанавливались до исходных уровней. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в миокарде *H. pomatia* образуется эндогенный NAADP, который способствует поддержанию спонтанных сокращений изолированного сердца.

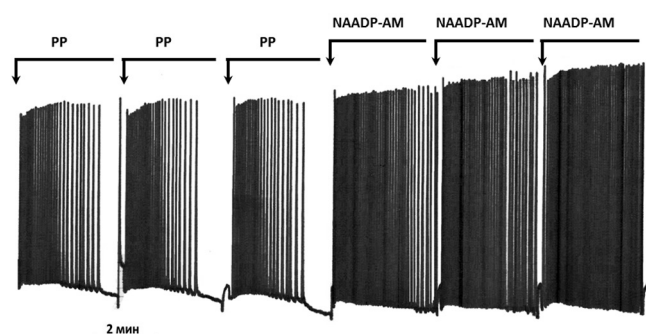


Рис. 2. Угасание спонтанных сокращений и остановка сердца *H. pomatia* при уменьшении объема PP в канюле до 100 мкл и восстановление сокращений при внесении в канюлю PP с 100 нМ NAADP-AM.

В контроле PP содержал 0,01% ДМСО, что соответствовало количеству этого растворителя, вносимого вместе с NAADP-AM.

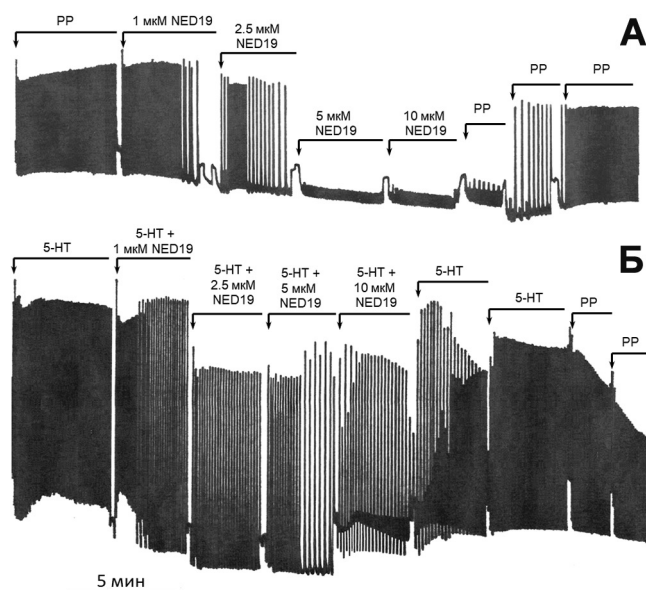


Рис. 3. Влияние NED19 на сокращение сердца *H. pomatia*. А — спонтанные сокращения; Б — сокращения в присутствии 0,5 мкМ серотонина (5-HT). PP — раствор Рингера.

Мощным активатором сердца *H. pomatia* является серотонин (5-НТ, 5-гидрокситриптамин). Влияние NED19 на сокращения сердца, активированного серотонином, существенно отличается от его действия на спонтанные сокращения (рис. 3Б). Увеличение концентрации NED19 от 1 до 5 мкМ вызывало постепенное снижение частоты сокращений. При концентрациях NED19 2,5–5 мкМ происходило некоторое снижение тонуса сердца и небольшое уменьшение амплитуды. Однако в отличие от спонтанных сокращений, сокращения сердца, активированного серотонином, не прекращались под влиянием NED19. При концентрации NED19 10 мкМ частота сокращений не падала, а, напротив, постепенно стабилизировалась на среднем уровне, который был реже исходного, но выше, чем при 5 мкМ NED19. После отмывания NED19 сердце начало сокращаться практически в исходном ритме. Отмывание сердца от серотонина приводило к постепенному снижению амплитуды сокращений до контрольного уровня.

NAADP вызывает высвобождение ионов кальция из лизосом и эндосом, внутренняя среда которых имеет слабокислое значение pH [7]. Повышенная концентрация Ca^{2+} в кислых эндосомах и лизосомах поддерживается благодаря антипорту протонов и Ca^{2+} . Закачивание ионов водорода в эти органеллы осуществляет протонная АТФаза V-типа. Чтобы определить, участвуют ли внутриклеточные хранилища Ca^{2+} в поддержании спонтанных сокращений сердца *H. pomatia*, мы использовали ингибитор H^+ -АТФазы V-типа бафиломицин А1. Ингибирование H^+ -АТФазы бафиломицином А1 приводит к повышению значений pH в интралюминальном пространстве лизосом и эндосом с последующим постепенным оттоком оттуда Ca^{2+} . Мы показали, что введение бафиломицина А1 в полость сердца в концентрации 10 мкМ не уменьшало амплитуду сокращений, но уменьшало время, в течение которого сердце было способно спонтанно сокращаться (рис. 4А). В представленном эксперименте сердечные сокращения прекратились через 6 мин после первого применения бафиломицина А1 (рис. 4Б). Смена раствора в канюле приводила к восстановлению сердечных сокращений, но через 6 мин сердце вновь останавливалось. При отмывании бафиломицина А1 путем двух последовательных смен содержимого канюли на PP сердце спонтанно сокращалось 12 мин без признаков угасания сокращений (рис. 4 Б). Однако если в канюле вновь проводилась смена контрольного PP на раствор с бафиломицином А1 длительность спонтанных сокращений вновь стала постепенно уменьшаться. После его четвертого добавления сокращения продолжались около 3,5 мин. Данный эффект можно объяснить увеличением утечки ионов кальция из лизосомоподобных депо после каждого применения бафиломи-

цина A1. Действие бафиломицина A1 было обратимым. При вымывании бафиломицина A1 раствором Рингера сердце вновь восстанавливало первоначальную способность к спонтанным сокращениям (рис. 4А).

Влияние NED19 на частоту спонтанных сокращений изолированного сердца куриного зародыша. Целью второго этапа исследований было оценить участие NAADP в поддержании ритма сокращений сердца позвоночных животных. В качестве экспериментальной модели было выбрано сердце куриного эмбриона на 4 сут инкубации, поскольку на этих стадиях развития оно еще не имеет иннервации и кровообращения и изолированное сердце спонтанно сокращается. Для оценки участия эндогенного NAADP в поддержании спонтанной сократительной активности сердца куриного эмбриона мы использовали его специфический антагонист NED19. На рис. 5 показано, что после добавления 10 мкМ NED19 ЧСС снижалась на $29,6 \pm 8,7\%$. Этот эффект был обратим – после отмывания сердца раствором Хэнкса ЧСС восстанавливалась до прежнего значения. При последующем увеличении концентрации NED19 в два раза (20 мкМ) ЧСС снизилась на $36,3 \pm 7,9\%$ от значения в контроле, однако эта величина не отличалась достоверно от таковой при 10 мкМ NED19 ($p > 0,05$). Сердечный ритм вновь полностью восстанавливается после промывки в растворе Хэнкса. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии эндогенного NAADP в поддержании ритма спонтанных сердечных сокращений сердца куриного эмбриона.

Обсуждение

Для изучения непосредственного действия NAADP на сердце нами был использован проникающий через мембрану клеток его ацетооксиметильный эфир, гидролизующийся в цитоплазме до свободного NAADP. Возможность проведения этих экспериментов была обусловлена выбором удачной модели – изолированного сердца виноградной улитки *H. pomatia*. Благодаря его небольшим размерам и тонким стенкам диффузия NAADP-АМ может проходить в глубину ткани миокарда. Мы установили, что доставленный таким образом в сердце NAADP увеличивает частоту и амплитуду спонтанных сокращений. Нами также было показано, что NAADP может предотвращать остановку сердца *H. pomatia*, восстанавливая спонтанные сокращения. При длительном воздействии NAADP-АМ одновременно с увеличением ЧСС наблюдалось нарушение ритма сокращений сердца *H. pomatia*, что, по-видимому, обусловлено избыточным накоплением NAADP в мышечных клетках и усиленной активацией в них обмена ионов кальция. Наши результаты согласуются с ранее полученными данными о том, что NAADP индуцирует спонтанные подъемы $[Ca^{2+}]_{цит}$ во время диастолы

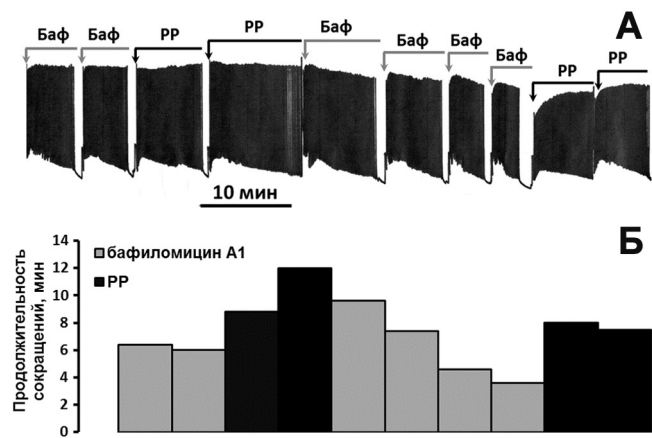


Рис. 4. Угасание спонтанных сокращений сердца *H. pomatia* при добавлениях к сердцу PP с 10 мкМ бафиломицина A1 (Баф) и восстановление сокращений при отмывании сердца от бафиломицина A1. А – диаграмма сокращений сердца *H. pomatia* при последовательных сменах PP с 10 мкМ бафиломицина A1 на PP с 0.1% ДМСО. PP с бафиломицином A1 заменяли на контрольный PP через 30–60 с после самопроизвольной остановки сердца. Б – продолжительность спонтанных сокращений сердца при воздействии бафиломицина A1 (серые столбики) и после его отмывки PP (черные столбики). Объем раствора в канюле составлял 200 мкл.

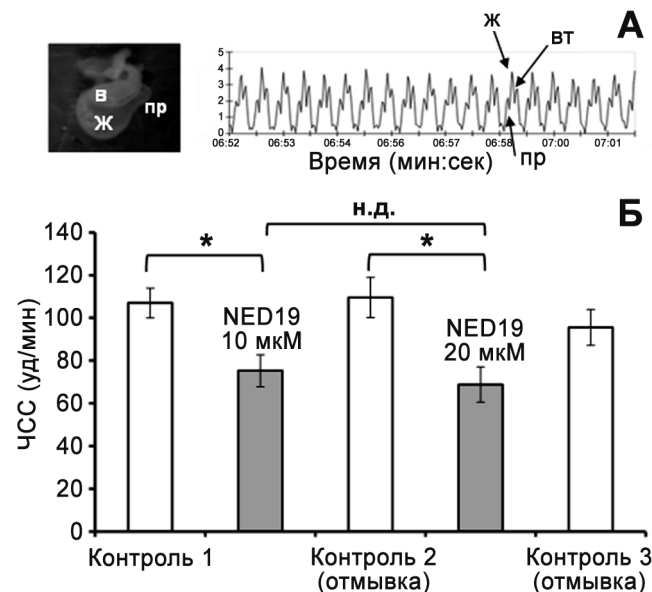


Рис. 5. Влияние NED19 на ритм спонтанных сокращений изолированного сердца куриного эмбриона. А – изолированное сердце куриного зародыша на 4 сут инкубации и пример типичной записи спонтанных сокращений, полученной в контрольных условиях с использованием программного обеспечения Danio Scope (Noldus). Структуры сердца и соответствующие им пики сокращений на записи обозначены буквами («пр» – предсердие, «ж» – желудочек и «вт» – выносящий тракт). Б – гистограмма, демонстрирующая эффект NED19 на частоту спонтанных сокращений сердца. Сначала приведено значение ЧСС перед добавлением NED19 (контроль 1), далее – при действии 10 мкМ NED19; затем после отмывки сердца в растворе Хэнкса (контроль 2), и после этого – при действии 20 мкМ NED19 и при последующей отмывке в растворе Хэнкса (контроль 3). На гистограмме представлены средние значения ЧСС $\pm$ стандартная ошибка среднего ($N = 14$); * – $p < 0,05$; критерий Уилкоксона. н.д. – отсутствие достоверных различий.

в электростимулированных кардиомиоцитах на фоне бета-адренергической стимуляции и вовлечен в возникновение аритмии, спровоцированной у мышей *in vivo* инъекцией изопротеренола [14]. Новым является то, что мы показали способность NAADP вызывать аритмию при отсутствии стимуляции сердца нейроэндокринными факторами. Антагонист NAADP NED19 дозозависимо замедлял ритм спонтанных сокращения сердца *H. pomatia*, а при концентрации 10 мкМ полностью их блокировал. Мы предполагаем, что это происходит в результате подавления активирующего действия эндогенного NAADP в сердце *H. pomatia*.

Исходя из ранее полученных другими авторами данных о действии NAADP на обмен кальция в кардиомиоцитах [12–14], мы предполагаем, что его влияние на сократимость сердца *H. pomatia* можно объяснить следующим образом: при повышении концентрации NAADP увеличивается высвобождение ионов кальция из эндосом и лизосом и тем самым быстрее достигается пороговый уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$, при котором запускается CICR. Благодаря этому при росте концентрации NAADP увеличивается частота сокращений, однако при его избыточном накоплении происходит наложение одиночных подъемов $[Ca^{2+}]_{цит}$, вызванных CICR, что приводит к аритмии в виде сдваивания и учетверения сокращений. Параллельно идет накопление ионов кальция в ретикулуме, рост пикового подъема $[Ca^{2+}]_{цит}$ и увеличение амплитуды сокращений. В сердце млекопитающих уровень NAADP возрастает при активации β -адренорецепторов [13, 22] и этот мессенджер участвует в передаче от них кальциевых сигналов [15, 23]. У моллюсков мощным активатором сокращений сердца является серотонин. Влияние серотонина на уровень NAADP не изучалось. Антагонист NAADP NED19 уменьшал частоту сокращений при активации сердца *H. pomatia* серотонином, но

не вызывал остановки сердца. Мы предполагаем, что при действии серотонина зависимость от эндогенного NAADP активация CICR способствует увеличению частоты, но этот механизм не является критическим для поддержания сокращений. По-видимому, в этих условиях в высвобождение ионов кальция из ретикулума включаются и другие механизмы повышения $[Ca^{2+}]_{цит}$. Мы показали, что ингибитор фосфолипазы C U73122 уменьшает активацию сокращения сердца *H. pomatia* серотонином (данные не приводятся). Это говорит об участии в данном процессе кальциевых каналов ретикулума, активируемых инозитол-1,4,5-трисфосфатом.

С помощью специфического антагониста NED19 мы продемонстрировали, что NAADP-зависимый механизм регуляции спонтанных сокращений реализуется у куриного зародыша на стадии эмбрионального развития до иннервации сердца. Ранее было установлено, что у позвоночных животных уровень NAADP участвует в активации сокращений под действием изопротеренола через бета-адренергические рецепторы [15, 23]. В данном случае участие бета-адренорецепторов можно исключить. Сокращение сердца куриного эмбриона происходит самопроизвольно. Таким образом, этот результат является новым, и он подтверждает идею о том, что одной из функций внутриклеточного NAADP является поддержание спонтанной сократительной активности сердца.

Работа выполнена в рамках Государственной программы фундаментальных исследований № 0088-2024-0009. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены этическим комитетом Института биологии развития имени Н.К. Кольцова (протокол №70 от 25.05.2023 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rakovic S., Galione A., Ashamu G.A., Potter B.V., Terrar D.A. A specific cyclic ADP-ribose antagonist inhibits cardiac excitation-contraction coupling. *Curr. Biol.* 1996;6(8):989–996.
2. Kawaguchi H., Sano H., Okada H., Iizuka K., Okamoto H., Kudo T., Murakami T., Kitabatake A. Increased calcium release from sarcoplasmic reticulum stimulated by inositol trisphosphate in spontaneously hypertensive rat heart cells. *Mol. Cell. Biochem.* 1993;119(1–2):51–57.
3. Lamers J.M., De Jonge H.W., Panagia V., Van Heugten H.A. Receptor-mediated signalling pathways acting through hydrolysis of membrane phospholipids in cardiomyocytes. *Cardioscience.* 1993;4(3):121–131.
4. Lee H.C. Cyclic ADP-ribose and NAADP: fraternal twin messengers for calcium signaling. *Sci. China. Life. Sci.* 2011;54(8):699–711.
5. Lee H.C., Aarhus R. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 1995;270(5):2152–2157.
6. Patel S., Marchant J.S., Brailoiu E. Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals. *Cell Calcium.* 2010;47(6):480–490.
7. Calcraft P.J., Ruas M., Pan Z., Cheng X., Arredouani A., Hao X., Tang J., Rietdorf K., Teboul L., Chuang K.T., Lin P., Xiao R., Wang C., Zhu Y., Lin Y., Wyatt C.N., Parrington J., Ma J., Evans A.M., Galione A., Zhu M.X. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature.* 2009;459(7246):596–600.
8. Zong X., Schieder M., Cuny H., Fenske S., Gruner C., Rotzer K., Griesbeck O., Harz H., Biel M., Wahl-Schott C. The two-pore channel TPCN2 mediates

NAADP-dependent Ca^{2+} -release from lysosomal stores. *Pflugers. Arch.* 2009;458(5):891–899.

9. Brailoiu E., Churamani D., Cai X., Schrlau M.G., Brailoiu G.C., Gao X., Hooper R., Boulware M.J., Dun N.J., Marchant J.S., Patel S. Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J. Cell. Biol.* 2009;186(2):201–209.

10. Churchill G.C., Okada Y., Thomas J.M., Genazzani A.A., Patel S., Galione A. NAADP mobilizes Ca^{2+} from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell.* 2002;111(5):703–708.

11. Negri S., Faris P., Moccia F. Endolysosomal Ca^{2+} signaling in cardiovascular health and disease. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2021;363:203–269.

12. Collins T.P., Bayliss R., Churchill G.C., Galione A., Terrar D.A. NAADP influences excitation-contraction coupling by releasing calcium from lysosomes in atrial myocytes. *Cell Calcium.* 2011;50(5):449–458.

13. MacGregor A., Yamasaki M., Rakovic S., Sanders L., Parkesh R., Churchill G.C., Galione A., Terrar D.A. NAADP controls cross-talk between distinct Ca^{2+} stores in the heart. *J. Biol. Chem.* 2007;282(20):15302–15311.

14. Nebel M., Schwoerer A.P., Warszta D., Siebrands C.C., Limbrock A.C., Swarbrick J.M., Fliegert R., Weber K., Bruhn S., Hohenegger M., Geisler A., Herich L., Schlegel S., Carrier L., Eschenhagen T., Potter B.V., Ehmke H., Guse A.H. NAADP mediated calcium signalling and arrhythmias in the heart evoked by beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* 2013;288(22):16017–16030.

15. Capel R.A., Bolton E.L., Lin W.K., Aston D., Wang Y., Liu W., Wang X., Burton R.A., Bloor-Young D., Shade K.T., Ruas M., Parrington J., Churchill G.C., Lei M., Galione A., Terrar D.A. Two-pore channels (TPC2s) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) at lysosomal-sarcoplasmic reticular junctions contribute to acute and chronic beta-adrenoceptor signaling in the heart. *J. Biol. Chem.* 2015;290(50):30087–30098.

16. Nechaeva M.V., Turpaev T.M. Rhythmic contractions in chick amnio-yolk sac and snake amnion during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2002;131(4):861–870.

17. Suslova I.V., Solomonova V.G., Yurchenko O.P., Turpaev T.M. Quantitative characteristics of negative inotropic effect of acetylcholine on the heart of the snail *Helix pomatia*. *Dokl. Biol. Sci.* 2005;404:325–328.

18. Нечаева М.В., Алексеева Т.А., Авдонин П.В. Влияние транс-NED19 на сердечный ритм куриного зародыша на ранних стадиях развития. *Материалы конференции с международным участием «Физиология и биохимия сигнальных систем»*, Москва, 23–25 октября 2018 г. М.: Изд-во «Перо»; 2018:65–66.

19. Федорова (Кузьмина) Е.С., Суханова И.Ф., Соломонова В.Г., Авдонин П.В. Роль двупоровых кальциевых каналов эндолизосомальных везикул в поддержании спонтанного ритма сокращения сердца. *Материалы конференции с международным участием «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»*, Пушкино, 2013. Пушкино: ИД В. Ема; 2013:237–240.

20. Соломонова В.Г., Авдонин П.П., Виниченко Е.С., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Активация сократимости сердца виноградной улитки *H. pomatia* под действием тромбина. Исследование роли cAMP. *Журн. эвол. биохим. физиол.* 2007;43(1):32–38.

21. Nechaeva M., Alekseeva T., Dobretsov M., Kubasov I. Chicken embryos can maintain heart rate during hypoxia on day 4 of incubation. *J. Comp. Physiol. B.* 2020;190(3):361–370.

22. Lewis A.M., Aley P.K., Roomi A., Thomas J.M., Masgrau R., Garnham C., Shipman K., Paramore C., Bloor-Young D., Sanders L.E., Terrar D.A., Galione A., Churchill G.C. beta-Adrenergic receptor signaling increases NAADP and cADPR levels in the heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;427(2):326–329.

23. Gul R., Park D.R., Shawl A.I., Im S.Y., Nam T.S., Lee S.H., Ko J.K., Jang K.Y., Kim D., Kim U.H. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) and cyclic ADP-ribose (cADPR) mediate Ca^{2+} signaling in cardiac hypertrophy induced by beta-adrenergic stimulation. *PLoS One.* 2016;11(3):e0149125.

Поступила в редакцию 01.04.2024

После доработки 14.05.2024

Принята в печать 20.05.2024

RESEARCH ARTICLE

The role of NAADP in maintaining spontaneous heart contractions: comparative physiological studies

E.S. Kuzmina¹, M.V. Nechaeva^{1, 2} , P.V. Avdonin^{1, *} 

¹Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova st., 26, Moscow, 119334, Russia;

²Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071, Russia

*e-mail: pavel.avdonin@idbras.ru

The goal of the work was to study the role of the second messenger NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate), which causes the release of Ca^{2+} ions from lysosomes and endosomes, in the regulation of heart contractions. Isolated hearts of the grape snail *Helix pomatia* and a chicken embryo were used as models. Using the membrane-permeable acetoxymethyl ester NAADP-AM, we showed that NAADP at nanomolar concentrations increases the frequency and amplitude of spontaneous cardiac contractions in *H. pomatia*. The

NAADP antagonist NED19, without affecting the amplitude of contractions, dose-dependently reduces their frequency, completely blocking spontaneous contractions of the mollusk heart at a concentration of 5 μM . The V-type H^+ -ATPase inhibitor bafilomycin A1 suppresses the accumulation of calcium ions in lysosomes and acidic endosomes. We have shown that bafilomycin A1 causes attenuation of spontaneous contractions and cardiac arrest in *H. pomatia*. Serotonin increases the amplitude of contractions of the *H. pomatia* heart without affecting heart rate. NED19 at saturating concentrations (10 μM) reduces the frequency of contractions when the snail heart is activated by serotonin, but only partially reduces their amplitude. In experiments with the isolated chick embryo heart, we showed that NED19 reduces the frequency of spontaneous contractions without affecting the amplitude of contractions. Based on the data obtained, a hypothesis was put forward that the release of calcium ions from lysosomes and endosomes under the influence of endogenous NAADP ensures the maintenance of spontaneous contractions of the heart.

Keywords: *calcium, heart contraction, NAADP, H. pomatia, chicken embryo*

Funding: The research was carried under the assignment of the State Basic Research Program of the Institute of Developmental Biology, project No. 0088-2024-0009.

Сведения об авторах

Кузьмина Елена Сергеевна — аспирант Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-70-09; e-mail: eskuzmina@list.ru

Нечаева Марина Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-70-09; e-mail: mane_c@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5101-3245>

Авдонин Павел Владимирович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лабораторией физиологии рецепторов и сигнальных систем Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-70-09; e-mail: pavel.avdonin@idbras.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4138-1589>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 597.556.331.5+591.185.31+591.53

Вкусовая привлекательность органических кислот и их производных для цихлидовых рыб (Cichlidae)

А.О. Касумян* , А.Д. Левина

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

*e-mail: alex_kasumyan@mail.ru

Сравнена вкусовая привлекательность 15 карбоновых и других органических кислот и их производных (аскорбиновая, лимонная, сорбиновая, яблочная, щавелевая, уксусная, гликолевая, α - и γ -аминомасляные кислоты, их соли Na^+ и K^+ ; 0,1 М) для пяти видов цихлидовых (Cichlidae) рыб — нильской *Oreochromis niloticus* и мозамбикской *O. mossambicus* тиляпий, золотого меланохрома *Melanochromis auratus*, апельсинового неолампрологуса *Neolamprologus leleupi* и цихлазомы Хартвега *Vieja hartwegi*. Лимонная и щавелевая кислоты, аскорбат Na^+ , сорбат и цитрат K^+ , оксалат аммония обладают для рыб привлекательным, либо безразличным вкусом, аскорбиновая и сорбиновая кислоты, цитрат Na^+ и малат Na^+ — отталкивающим, либо также безразличным вкусом. Яблочная кислота имеет привлекательный вкус для цихлазомы, отталкивающий — для мозамбикской тиляпии и безразличный вкус для других цихлид. Уксусная кислота и изомеры аминотмасляной кислоты индифферентны по вкусу для всех рыб. Вкусовая привлекательность органических кислот может быть иной по сравнению с солями, образованными на их основе. Привлекательность солей выше, чем у соответствующих кислот в 10 случаях из 28, в 4 случаях — ниже, в 14 случаях не изменяется. Преобразование аскорбиновой и сорбиновой кислот в соли Na^+ и K^+ сопровождается повышением вкусовой привлекательности у большинства цихлид, яблочной кислоты в малат Na^+ — у половины видов. Для большинства рыб лимонная кислота и ее соли Na^+ и K^+ обладают сходной привлекательностью. Щавелевая кислота по сравнению с оксалатом аммония имеет более высокую привлекательность для неолампрологуса, более низкую — для мозамбикской тиляпии и одинаковые вкусовые свойства для остальных трех видов рыб. Различия между потреблением гранул с изомерами аминотмасляной кислоты и гранул с уксусной и гликолевой (гидроксиуксусной) кислотой отсутствуют у всех цихлид. Пищевое поведение, проявляемое цихлидами в ходе оросенсорного тестирования гранул, похоже — рыбы совершают небольшое число отверганий и повторных схватываний гранул, длительность их удержания в ротовой полости сходная.

Ключевые слова: хеморецепция, вкусовая рецепция, вкусовые предпочтения, карбоновые кислоты, пищевое поведение, цихлидовые рыбы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-7

Введение

Изучение хеморецепции у рыб — наиболее крупной и разнообразной группы позвоночных животных, проводится на биологическом факультете МГУ со второй половины прошлого века. Многие годы основное внимание уделялось изучению структуры и функции обонятельной системы и запаховой сигнализации в коммуникациях рыб. Научным руководителем этих исследований, выполнявшихся совместно сотрудниками кафедры ихтиологии и кафедры физиологии человека и животных, была Г.А. Малюкина, ученица Х.С. Коштыянца [1]. В настоящее время работы

в области хеморецепции рыб продолжаются на кафедре ихтиологии, а проводимые исследования сосредоточены главным образом на выяснении функциональных возможностей вкусовой системы и ее значения в обеспечении пищевой избирательности рыб.

Вкусовая система у рыб высоко развита. Вкусовые почки имеют типичное для всех позвоночных строение, но у рыб их количество в десятки и сотни раз больше, распределены они по всей ротовой и жаберной полостям, а у многих видов находятся на поверхности тела — головы, туловища и плавников. На многих примерах показано, что

вкусовая чувствительность у рыб на несколько порядков выше, чем у амфибий, рептилий и млекопитающих [2–3].

Наличие большого массива данных о вкусовой системе рыб, полученных морфологическими, электрофизиологическими, молекулярно-генетическими и иными методами, долгое время сочеталось с полным отсутствием сведений о реакциях на вкусовые раздражители, проявляемых на организменном уровне. Создание и применение специальных поведенческих тестов позволило в последние 10–20 лет преодолеть этот разрыв и оценить вкусовые предпочтения нескольких десятков видов рыб, разных по таксономическому положению, образу жизни и питанию, выяснить насколько вкусовые ответы зависят от внешних факторов, возраста и других особенностей. Было обнаружено, что вкусовые спектры характеризуются высокой видовой специфичностью и различаются даже у близкородственных видов (представителей одного рода или семейства) и у рыб, сходных по потребляемым организмам, имеющих совпадающие ареалы (симпатрия) и занимающих в водоемах сходные экологические ниши. Однако своеобразие вкусовых спектров выражено слабо или не проявляется при внутривидовых сравнениях — у особей разных популяций, биологических форм, пола или с разным внутривидовым статусом и пищевым опытом [4–6].

Методы, основанные на поведенческих тестах, позволяют также исследовать молекулярно-физиологические особенности и свойства вкусовой рецепции животных, в том числе их способность различать свойства веществ, близких по структуре молекулы [7–8]. Такие работы на рыбах остаются эпизодическими, они выполнены с использованием отдельных аминокислот, их изомеров и некоторых производных и показывают, что модификация молекулы может приводить к изменениям вкусовых качеств веществ для рыб [9–10]. В какой мере эти выводы могут быть распространены на другие группы химических веществ и вызывают ли одни и те же изменения молекулы веществ сходные сдвиги их вкусовых свойств для рыб разных видов остается не выясненным. Особый интерес в этом отношении представляют карбоновые кислоты, относящиеся, как и аминокислоты, к веществам, наиболее распространенным в организмах, которыми питаются рыбы, и участвующим в важнейших метаболических процессах [11–12]. Учитывая высокую видовую специфичность вкусовых спектров особый интерес представляет сравнение вкусовых ответов на сходные вещества у близкородственных видов рыб, таких как цихлидовые (Cichlidae), являющиеся удобными объектами для экспериментальных работ [10, 13].

Целью настоящего исследования стало сравнение вкусовой привлекательности некоторых

карбоновых и других органических кислот и их производных для цихлидовых рыб, а также сравнение пищевого поведения, проявляемого этими рыбами при оросенсорном тестировании объектов, содержащих исследуемые вещества.

Материалы и методы

Объекты исследования. Эксперименты выполнены на молоди мозамбикской тилляпии *Oreochromis mossambicus* (длина тела 3,5–4,5 см, 15 экз.), половозрелой нильской тилляпии *O. niloticus* (12,0–15,0 см, 12 экз.) и цихлазоме Хартвега *Vieja hartwegi* (длина тела 7,0–9,0 см, 15 экз.) и близких к половой зрелости апельсиновом неолампрологусе *Neolamprologus leleupi* (5,5–6,5 см, 15 экз.) и золотом меланохроме *Melanochromis auratus* (6,0–7,0 см, 15 экз.). Нильская и мозамбикская тилляпии предоставлены ООО «Craft Tau Ltd.» (Москва), остальные рыбы приобретены в аквариумной компании «Аква Лого» (Москва). Рыб до начала опытов содержали в общих аквариумах (150–200 л) не менее двух недель при температуре воды 24°C и ежедневном кормлении живыми или свежемороженными личинками хирономид Chironomidae.

Изготовление гранул. Гранулы вырезали из агар-агарового геля (Reanal, 2%). В раствор агар-агара (60–70°C) вносили красный краситель Ponceau 4R (5 мкМ; Chroma-Gesellschaft Schmidt GmbH, Германия), а также одно из 15 тестируемых веществ (0,1 М): лимонную кислоту, цитрат Na⁺ (тринатриевая соль лимонной кислоты), цитрат K⁺ (трикалийная соль лимонной кислоты), щавелевую кислоту, оксалат аммония (аммоний щавелевокислый), яблочную кислоту, малат Na⁺ (двунатриевая соль яблочной кислоты), сорбиновую кислоту, сорбат K⁺ (калийная соль сорбиновой кислоты), уксусную и гликолевую кислоты, α- и γ-аминомасляную кислоты, аскорбиновую кислоту и аскорбат Na⁺ (натриевая соль аскорбиновой кислоты) (Sigma, США; Fluka, Швейцария). Готовили агар-агаровый гель с водным экстрактом личинок хирономид (175 г/л) и гель, содержащий только краситель для изготовления контрольных гранул. Гели с экстрактом хранили при 5°C не более 3 сут, остальные — до двух недель при тех же условиях. Гранулы вырезали из геля непосредственно перед внесением их в аквариум. Все гранулы имели длину 4 мм, диаметр гранул соответствовал размерам ротового отверстия рыб и был 2,00 мм в опытах с нильской тилляпией и цихлазомой Хартвега, 1,35 мм — в опытах с золотым меланохромом и апельсиновым неолампрологусом и 0,95 мм — в опытах с мозамбикской тилляпией.

Подготовка рыб к опытам. Рыб размещали поодиночке в прямоугольные аквариумы (10 л) с непрозрачными стенками кроме передней. Воду аэрировали микрокомпрессорами АЗН–4, температуру воды поддерживали ~ 24°C регулирующими

термонагревателями Aquael Easy Heater 25 W (Aquael, Польша). Грунт в аквариумах отсутствовал. Рыб кормили живыми личинками хирономид один раз в сутки (~ 18:00), излишки корма удаляли через 15 мин после его внесения в аквариум.

До начала опытов в течение 2–3 сут рыб обучали схватывать подаваемых поштучно живых личинок хирономид, а затем подаваемые поштучно гранулы с экстрактом хирономид. Обучение завершали после того, как все рыбы подплывали и быстрым броском схватывали поданную гранулу в течение первых 2–3 с после падения ее в воду.

Процедура тестирования. В аквариум вносили одну гранулу и регистрировали число совершенных рыбой схватываний, длительность удержания гранулы после первого схватывания и в течение всего опыта и потребление – была ли гранула проглочена или отвергнута рыбой к концу опыта. Об отказе от потребления судили по прекращению повторных схватываний и потере рыбой интереса к грануле. Каждый опыт продолжался ~1–2 мин. Если рыба не схватывала поданную гранулу в течение первой минуты, или потребление гранулы невозможно было определить из-за ее фрагментации, опыт не учитывали. Несъеденную гранулу или ее фрагменты удаляли из аквариума сразу после окончания опыта. Гранулы с разными веществами подавали рыбам в случайной последовательности, с каждой рыбой выполняли сходное число опытов с каждым типом гранул. Подачу гранул с веществами чередовали с подачей гранул с экстрактом личинок хирономид для оценки пищевой мотивации

подопытных рыб и с подачей контрольных гранул. Интервал между опытами составлял не менее 10–15 мин. В течение дня каждая из рыб получала не более 30–35 гранул. Детальная процедура приготовления гранул и проведения опытов изложена ранее [14]. Опыты на разных видах рыб выполнены в виде последовательных сессий.

Объем материала. Число выполненных опытов – 5895, из них на нильской тилапии – 1291, на мозамбикской тилапии – 1150, цихлаземе – 1109, неолампрологусе – 1095, меланохроме – 1250. Для статистического анализа результатов использовали критерий χ^2 (сравнение потребления гранул), *U*-критерий Манна–Уитни (сравнение числа схватываний и длительности удержаний гранул). Вычисляли также индекс вкусовой привлекательности по формуле: $Ind_{pal} = (R - C) / (R + C) \times 100$, где *R* – потребление гранул с веществом, %; *C* – потребление контрольных гранул, %.

Результаты и обсуждение

Вкусовая привлекательность веществ. Подвергнутые тестированию вещества обладают для рыб привлекательным, отталкивающим и безразличным вкусом. Больше всего веществ, стимулирующих заглатывание схваченных гранул, у нильской и мозамбикской тилапий – 4 и 3 из 8 и 15 соответственно, использованных для экспериментов (табл. 1). Соотношение веществ с разными вкусовыми качествами хорошо согласуется у тилапий с выполненными ранее оценками, в которых тестированию подвергнуты аминокислоты и другие

Таблица 1

Потребление агар-агаровых гранул (*M* ± *m*) с органическими кислотами и их производными (0,1 М) цихлидовыми рыбами

Вещество	Нильская тилапия		Мозамбикская тилапия		Золотой меланохром		Апельсиновый неолампрологус		Цихлазома Хартвега	
	<i>C</i>	<i>n</i>	<i>C</i>	<i>n</i>	<i>C</i>	<i>n</i>	<i>C</i>	<i>n</i>	<i>C</i>	<i>n</i>
Аскорбиновая кислота			16,7 ± 4,7***	66	31,1 ± 5,5**	74	28,1 ± 5,7	64	43,6 ± 6,4	62
Аскорбат натрия			63,8 ± 5,9**	69	47,3 ± 5,9	74	62,9 ± 6,2***	62	47,8 ± 6,2	67
Лимонная кислота	78,1 ± 5,2*	73	48,5 ± 6,2	68	50,7 ± 5,9	73	40,9 ± 6,1	66	66,2 ± 5,9	65
Цитрат натрия	60,0 ± 5,7	75	54,4 ± 6,1	68	38,4 ± 5,8*	73	29,7 ± 5,8	64	35,8 ± 5,9**	67
Цитрат калия	66,7 ± 5,6	72	35,3 ± 5,9	68	47,3 ± 5,9	74	75,0 ± 5,5***	64	49,2 ± 6,3	65
Сорбиновая кислота	41,7 ± 6,1*	68	24,2 ± 5,4*	66	41,7 ± 5,9	72	16,7 ± 4,6*	66	46,2 ± 6,2	65
Сорбат калия	97,1 ± 2,0***	70	64,7 ± 5,9**	68	59,5 ± 5,8	74	20,3 ± 5,1	64	50,8 ± 6,3	63
Шавелевая кислота	87,0 ± 4,1**	69	32,4 ± 5,8	68	47,3 ± 5,9	74	47,8 ± 6,2	67	53,8 ± 6,2	65
Оксалат аммония	83,1 ± 4,7**	65	61,2 ± 6,0*	67	52,1 ± 5,9	73	25,8 ± 5,4	66	69,7 ± 5,7	66
Яблочная кислота			20,9 ± 5,0**	67	47,3 ± 5,9	74	29,7 ± 5,8	64	82,8 ± 4,8**	64
Малат натрия			55,9 ± 6,1	68	31,0 ± 5,6**	71	46,7 ± 6,4	62	73,1 ± 5,5	67
α-Аминомасляная кислота			57,4 ± 6,1	68	60,8 ± 5,8	74	31,8 ± 5,9	63	69,7 ± 7,7	66
γ-Аминомасляная кислота			44,1 ± 6,1	68	48,0 ± 5,9	75	28,1 ± 5,7	64	64,7 ± 5,8	68
Уксусная кислота	73,5 ± 5,4	68	41,2 ± 6,1	68	41,9 ± 5,8	74	24,6 ± 5,4	65	65,2 ± 5,9	65
Гликолевая кислота			44,1 ± 6,1	68	39,2 ± 5,8*	74	12,9 ± 4,3**	62	73,0 ± 5,6	63
Экстракт Chironomidae	93,6 ± 1,3***	374	84,9 ± 4,5***	66	76,7 ± 5,0*	73	75,7 ± 5,3***	66	75,4 ± 5,4*	65
Контроль	63,0 ± 2,6	357	43,5 ± 6,1	69	56,8 ± 5,8	74	33,3 ± 5,9	66	59,1 ± 6,1	66

Примечание: *C* – потребление гранул, %; *n* – число опытов; *M* ± *m* – среднее значение показателя и его ошибка; концентрация водного экстракта Chironomidae – 175 г/л; отличия от контроля достоверны при *p*: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

вещества [13–14]. У меланохрома, питающегося в природе, как и тилипии, растениями, вещества с привлекательным вкусом не обнаружены, у неолампрологуса и цихлазомы, использующих в пищу в основном водных животных, соотношение привлекательных и отталкивающих веществ равное, но эти вещества разные (табл. 2).

Яблочная кислота вызывает у цихлид противоположные по проявлению вкусовые ответы – усиление потребления гранул в 1,4 раза (относительно контроля) у цихлазомы и снижение потребления в 2,1 раза у мозамбикской тилипии. Включение яблочной кислоты в состав гранул не влияет на их потребление меланохромом и неолампрологусом. Уксусная кислота и изомеры аминокислотной кислоты индифферентны по вкусу для всех рыб. Остальные вещества обладают привлекательным или безразличным вкусом (лимонная и щавелевая кислоты, аскорбат Na^+ , сорбат и цитрат K^+ , оксалат аммония), либо отталкивающим или безразличным вкусом (аскорбиновая и сорбиновая кислоты, цитрат и малат Na^+) (табл. 1). Достоверная корреляция между потреблением гранул с веществами мозамбикской тилипией, меланохромом, неолампрологусом и цихлазмой отсутствует ($p > 0,05$), что соответствует представлениям о видовой специфичности и отсутствию связи вкусовых предпочтений с образом жизни, питанием и филогенией рыб [6]. Безразличное или отталкивающее отношение цихлид и других исследованных рыб к вкусу аскорбиновой кислоты [15–17] указывает на то, что очевидная связь между пищевой потребностью в важных микронутриентах (витамин С) и их вкусовыми свойствами не прослеживается. Такой же вывод получен при сопоставлении вкусовых предпочтений, проявляемых рыбами по отношению к заменимым и незаменимым аминокислотам [6].

Сравнение вкусовой привлекательности органических кислот и их производных. Потребление гранул с аскорбиновой кислотой ниже, чем с аскорбатом Na^+ , это различие достоверно у всех видов рыб, за исключением цихлазомы (на нильской тилипии оценка не проведена). Потребление гранул с лимонной кислотой по сравнению с цитратом Na^+ выше у нильской тилипии, неолампрологуса и цихлазомы и сходное у мозамбикской

тилипии и меланохрома. Но потребление гранул с лимонной кислотой почти в 2 раза ниже, чем с цитратом K^+ у неолампрологуса, у остальных видов различия отсутствуют. Вкусовая привлекательность цитрата Na^+ и цитрата K^+ разная у мозамбикской тилипии и неолампрологуса. Вкусовая привлекательность малата Na^+ по сравнению с яблочной кислотой выше у мозамбикской тилипии и неолампрологуса, ниже у меланохрома и одинакова у цихлазомы. Потребление гранул с сорбиновой кислотой ниже, чем с сорбатом K^+ у нильской и мозамбикской тилипий и меланохрома, потребление гранул с щавелевой кислотой ниже, чем с оксалатом аммония у мозамбикской тилипии, но выше у неолампрологуса. Различия между потреблением изомеров аминокислотной кислоты и между уксусной и гликолевой (гидроксиуксусной) кислотой отсутствуют у всех исследованных цихлид (рисунок).

Полученные результаты показывают, что вкусовая привлекательность органических кислот может быть иной по сравнению с солями, образованными на их основе. Привлекательность солей выше, чем у соответствующих кислот в 10 случаях из 28, в 4 случаях – ниже, в 14 случаях, т.е. в 50% от всех возможных вариантов сравнения, сохраняется прежней. Преобразование аскорбиновой и сорбиновой кислот в соли Na^+ или K^+ сопровождается повышением вкусовой привлекательности у большинства цихлид, яблочной кислоты в малат Na^+ – у половины видов. Для большинства рыб лимонная кислота и ее соли Na^+ и K^+ обладают сходной привлекательностью. Щавелевая кислота по сравнению с оксалатом аммония имеет более высокую привлекательность для неолампрологуса, более низкую – для мозамбикской тилипии и одинаковые вкусовые свойства для остальных трех видов рыб (табл. 3). Таким образом, органические кислоты и их соли могут обладать для рыб разными, вплоть до диаметрально противоположных, вкусовыми свойствами. У исследованных видов рыб эти различия не совпадают, в том числе у близкородственных рыб, таких как нильская и мозамбикская тилипии, принадлежащие к одному роду *Oreochromis* и входящих в одну трофическую категорию (растительноядные рыбы).

Таблица 2

Соотношение числа веществ с привлекательным, отталкивающим и безразличным вкусом у цихлидовых рыб

Рыбы	Вещества, обладающие вкусом:				Источник
	привлекательным	отталкивающим	безразличным	всего	
Нильская тилипия	4	1	3	8	Наши данные
	20	0	17	37	[14]
Мозамбикская тилипия	3	3	9	15	Наши данные
	4	8	25	37	[13]
Золотой меланохром	0	4	11	15	Наши данные
Апельсиновый неолампрологус	2	2	11	15	Наши данные
Цихлазома Хартвега	1	1	13	15	Наши данные

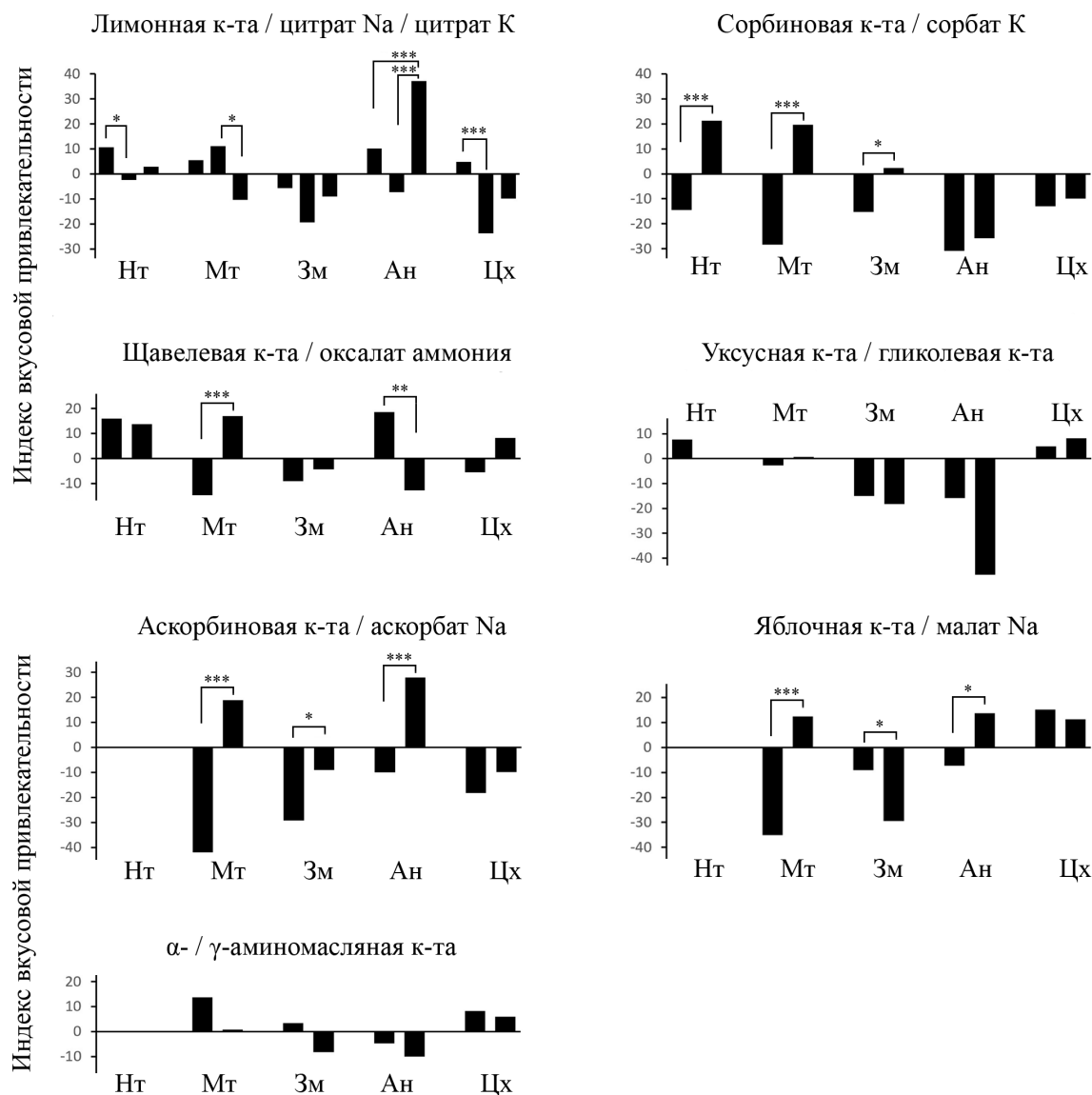


Рисунок. Индекс вкусовой привлекательности органических кислот и их производных для цихлидовых рыб. *Обозначения:* Нт – нильская тилапия *Oreochromis niloticus*, Мт – мозамбикская тилапия *O. mossambicus*, Зм – золотой меланохром *Melanochromis auratus*, Ан – апельсиновый неолампрологус *Neolamprologus leleupi*, Цх – цихлазома Хартвега *Vieja hartwegi*; *, ** и *** – различия потребления гранул с разными веществами достоверны при p : < 0,05, < 0,01, < 0,001 соответственно (критерий Манна-Уитни).

Таблица 3

Сравнительная вкусовая привлекательность органических кислот и их производных для цихлидовых рыб

Вещества	Нильская тилапия	Мозамбикская тилапия	Золотой меланохром	Апельсиновый неолампрологус	Цихлазома Хартвега
Аскорбиновая кислота : аскорбат Na ⁺		<***	<*	<***	=
Яблочная кислота : малат Na ⁺		<***	>*	<*	=
Лимонная кислота : цитрат Na ⁺	>*	=	=	=	>***
Лимонная кислота : цитрат K ⁺	=	=	=	<***	=
Сорбиновая кислота : сорбат K ⁺	<***	<***	<*	=	=
Цитрат Na ⁺ : цитрат K ⁺	=	>*	=	<***	=
Щавелевая кислота : оксалат аммония	=	<***	=	>**	=
α- : γ-аминомасляная кислота		=	=	=	=
Уксусная кислота : гликолевая кислота		=	=	=	=

Примечание: >, < и = – соответственно более высокая, низкая или сходная вкусовая привлекательность первого вещества относительно второго. * ** и *** – различия потребления гранул с разными веществами достоверны при p : < 0,05, < 0,01, < 0,001 (критерий Манна-Уитни).

Столь же разнообразно соотношение вкусовой привлекательности кислот и их солей для рыб одного вида. Для нильской тилапии, меланохрома и неолампрологуса вкусовая привлекательность кислот может быть выше, ниже или такой же как у соответствующей соли. Для мозамбикской тилапии вкусовая привлекательность большинства кислот ниже, чем у солей, для цихлазомы вкусовые свойства кислот и их солей в большинстве случаев совпадают (табл. 3). Для человека кислый вкус всех испытанных карбоновых кислот, включая лимонную, многократно выше, чем у соответствующей соли Na^+ [18]. Интенсивность ощущения кислого вкуса определяется не только способностью к диссоциации и протонированию органических кислот, но и строением их молекулы и особенностями рецепторных белков, обеспечивающих чувствительность к кислотам [19–21]. Существуют, по-видимому, и иные механизмы вкусовой рецепции, объясняющие, внутри- и межвидовое разнообразие вкусовой эффективности кислот и их солей и, в частности, привлекательный или отталкивающий вкус солей тех кислот, которые для рыб имеют безразличный вкус (яблочная кислота и малат Na^+ — для меланохрома; щавелевая кислота и оксалат аммония — для мозамбикской тилапии, и др.) или разную вкусовую привлекательность разных солей одной и той же кислоты (цитраты Na^+ и K^+ — для неолампрологуса).

Общий признак для исследованных цихлидовых рыб — сходство вкусовых ответов на гранулы с уксусной и гликолевой кислотами, различающихся наличием в молекуле гидроксильной группы, и сходство вкусовых ответов на гранулы с изомерами аминокислотной кислоты с α - и γ -положением аминогруппы. Однако у карповых (Cyprinidae) и других рыб отношение к вкусу веществ изменяется при появлении в их молекуле ОН-группы или при изменении положения или числа amino- и других функциональных групп [9–10, 17]. Различается и амплитуда электрических ответов во вкусовых нервах у многих видов рыб при стимуляции вкусовых почек растворами таких веществ [3, 22–23]. Учитывая, что семейство цихлидовых рыб насчитывает около 1800 валидных видов [24], можно уверенно полагать, что среди них присутствуют виды, для которых подобные структурные модификации веществ приводят к значимым сдвигам их вкусовых свойств.

Пищевое поведение. Цихлиды — дневные рыбы с хорошо развитым зрением. Подаваемую гранулу подопытные рыбы схватывают быстрым прицельным броском в течение первых 2–3 с. Промежуточные отвергания гранулы для повторного ее схватывания в ходе опыта совершают редко. Наименее склонна к таким действиям цихлазома — в среднем не более 1,1 схватываний, наиболее часто повторные схватывания совершает меланохром — в среднем до 1,4–1,6 за опыт. Для мелано-

хрома характерно также и наиболее длительное удержание гранулы в ротовой полости, которое в среднем длится от 5–6 до 7–9 с при первом схватывании и от 6–7 до 8–10 с суммарно в течение опыта. Наиболее короткое время удержания гранулы у неолампрологуса — 2–3 с. Число повторных схватываний и длительность удержания гранул с разными веществами сходное — небольшие, но статистически значимые различия относительно контроля обнаружены лишь в единичных случаях и не у всех видов рыб. Таким образом, пищевое поведение, проявляемое в ходе тестирования гранул, в отличие от вкусовых предпочтений, у разных цихлид похоже. Все они совершают небольшое число отверганий и повторных схватываний гранул, что, возможно, связано с социальным образом жизни этих рыб [14, 25].

Заключение

Выполненное исследование показывает, что органические кислоты и их производные обладают значимыми, но разными вкусовыми свойствами для исследованных цихлид. Это подтверждает видоспецифичность вкусовых спектров у рыб, выявленную ранее на примере свободных аминокислот. Подтверждено также, что вещества могут приобретать иные, в том числе противоположные, вкусовые качества при модификации молекулы, в частности, при преобразовании органических кислот в их соли. Поэтому практикуемое в ряде исследований выравнивание pH вкусовых стимульных растворов органических кислот с помощью NaOH и других щелочных агентов [19, 23, 26–32], может приводить к некорректным результатам и выводам. Высокая физиологическая потребность животных в определенных питательных веществах, по-видимому, не предопределяет наличие у таких веществ особых вкусовых качеств.

Способность ощущать кислый вкус считают эволюционно наиболее рано возникшей формой вкусовой чувствительности. Рецепторы, позволяющие воспринимать вещества, вызывающие кислый вкус у человека, обнаруживают даже у далеких предковых групп позвоночных животных, а функциональность генов, кодирующих вкусовые рецепторы к таким веществам сохраняется, как полагают, на протяжении всей эволюционной истории [20–21, 33–34]. Сведения о реакциях позвоночных животных на кислоты остаются ограниченными. Расширение этих знаний, особенно за счет рыб, являющихся удобными модельными объектами для экспериментальных исследований, важно для понимания не только исторических закономерностей развития вкусовой чувствительности, но и выяснения механизмов и особенностей вкусовой рецепции.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24–24–00009. Авто-

ры подтверждают, что все эксперименты проведены в соответствии с действующими принципами и правилами обращения с животными и что не был причинен вред рыбам, использовавшимся в экспериментах. Условия содержания рыб и метод, применявшийся в настоящем исследовании, одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени

М.В. Ломоносова (заявка № 170-ж на экспертизу исследования рассмотрена и одобрена Комиссией по биоэтике МГУ 15.02.2024, заседание № 159-д-з). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанного с публикацией данной статьи. Авторы искренне благодарны А.А. Кажлаеву (МГУ) за помощь в содержании рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Малюкина Г.А., Касумян А.О., Марусов Е.А. Экологические аспекты химической сигнализации рыб. *Вопр. ихтиологии*. 1990;30(6):891–896.
2. Hara T.J. Neurophysiology of gustation. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Vol. 1. Ed. A.P. Farrell. San Diego: Elsevier; 2011:218–226.
3. Hara T.J. Morphology of the gustatory (taste) system in fishes. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Vol. 1. Ed. A.P. Farrell. San Diego: Elsevier; 2011:187–193.
4. Kasumyan A., Døving K.B. Taste preferences in fish. *Fish Fish*. 2003;4(4):289–347.
5. Morais S. The physiology of taste in fish: potential implications for feeding stimulation and gut chemical sensing. *Rev. Fish. Sci. Aquacult*. 2017;25(2):133–149.
6. Kasumyan A. The taste system in fish. *Encyclopedia of fish physiology, second edition*. Vol. 1. Eds. S.L. Alderman and E.T. Gillis. Amsterdam: Elsevier, Academic Press; 2024:106–123.
7. Oike H., Nagai T., Furuyama A., Okada S., Aihara Y., Ishimaru Y., Marui T., Matsumoto I., Misaka T., Abe K. Characterization of ligands for fish taste receptors. *J. Neurosci*. 2007;27(21):5584–5592.
8. Bachmanov A.A., Bosak N.P., Glendinning J.I., Inoue M., Li X., Manita S., McCaughey S.A., Murata Y., Reed D.R., Tordoff M.G., Beauchamp G.K. Genetics of amino acid taste and appetite. *Adv. Nutr*. 2016;7(4):806S–822S.
9. Kasumyan A.O., Mouromtsev G.E. The teleost fish, blue gourami *Trichopodus trichopterus*, distinguishes the taste of chemically similar substances. *Sci. Rep*. 2020;10(1):7487.
10. Левина А.Д., Касумян А.О. Вкусковая привлекательность изомеров аминокислот для цихлидовых рыб (Cichlidae). *Вопр. ихтиологии*. 2024;64(1):86–97.
11. Liu C., Meng F., Tang X., Shi Y., Wang A., Gu Z., Pan Z. Comparison of nonvolatile taste active compounds of wild and cultured mud crab *Scylla paramamosain*. *Fish. Sci*. 2018;84(5):897–907.
12. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry*. 8th edition. N.-Y.: W.H. Freeman and Comp.; 2021. 4381 pp.
13. Kasumyan A., Levina A. Are the taste preferences similar in closely related fish of the same trophic category? A case of Nile and Mozambique tilapias. *Rev. Fish Biol. Fish*. 2023;33(4):1371–1386.
14. Levina A.D., Mikhailova E.S., Kasumyan A.O. Taste preferences and feeding behavior in the facultative herbivore fish, Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Biol*. 2021;98(1):1385–1400.
15. Касумян А.О., Прокопова О.М. Вкусовые предпочтения и динамика вкусового поведенческого ответа у линя *Tinca tinca* (Cyprinidae). *Вопр. ихтиологии*. 2001;41(5):670–685.
16. Михайлова Е.С., Касумян А.О. Вкусовые свойства карбоновых кислот для девятииглой колюшки *Pungitius pungitius*. *Вопр. ихтиологии*. 2018;58(4):496–502.
17. Касумян А.О., Исаева О.М. Вкусовые предпочтения карповых рыб (Cyprinidae). Сравнительное исследование. *Вопр. ихтиологии*. 2023;63(1):81–109.
18. Ganzvles P.G.J., Kroeze J.H.A. The sour taste of acids. The hydrogen ion and the undissociated acid as sour agents. *Chem. Senses*. 1987;12(4):563–576.
19. Neta E.R.C., Johanningsmeier S.D., Drake M.A., McFeeters R.F. A chemical basis for sour taste perception of acid solutions and fresh-pack dill pickles. *J. Food Sci*. 2007;72(6):S352–S359.
20. Tu Y.-H., Cooper A.J., Teng B., Chang R.B., Artiga D.J., Turner H.N., Mulhall E.M., Ye W., Smith A.D., Liman E.R. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science*. 2018;359(6379):1047–1050.
21. Frank H.E.R., Amato K., Trautwein M., Maia P., Liman E.R., Nichols L.M., Schwenk K., Breslin P.A.S., Dunn R.R. The evolution of sour taste. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci*. 2022;289(1968):20211918.
22. Caprio J. Olfaction and taste in the channel catfish: an electrophysiological study of the responses to amino acids and derivatives. *J. Comp. Physiol. A*. 1978;123(4):357–371.
23. Marui T., Harada S., Kasahara Y. Gustatory specificity for amino acids in the facial taste system of the carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Comp. Physiol. A*. 1983;153(3):299–308.
24. Nelson J.S., Grande T.C., Wilson M.V.H. *Fishes of the world*. New Jersey: Wiley; 2016. 707 pp.
25. Gonçalves-de-Freitas E., Bolognesi M.C., Gauy A.C.S., Brandão M.L., Giaquinto P.C., Fernandes-Castilho M. Social behavior and welfare in Nile tilapia. *Fishes*. 2019;4(2):23.
26. Yoshii K., Kamo N., Kurihara K., Kobatake Y. Gustatory responses of eel palatine receptors to amino acids and carboxylic acids. *J. Gen. Physiol*. 1979;74(3):301–317.
27. Kiyohara S., Yamashita S., Harada S. High sensitivity of minnow gustatory receptors to amino acids. *Physiol. Behav*. 1981;26(6):1103–1108.
28. Michel W.C., Kohbara J., Caprio J. Amino acid receptor sites in the facial taste system of the sea catfish *Arius felis*. *J. Comp. Physiol. A*. 1993;172(2):129–138.
29. Kohbara J., Caprio J. Taste responses of the facial and glossopharyngeal nerves to amino acids in the rainbow trout. *J. Fish Biol*. 2001;58(4):1062–1072.
30. Kohbara J., Oohara K., Masuda T., Hidaka I., Takii K., Kumai H. Gustatory receptor responses in marbled rockfish *Sebastes marmoratus*. *Fish. Sci*. 2002;68(4):862–871.
31. Kohbara J., Miyazaki T., Takii K., Hosokawa H., Ukawa M., Kumai H. Gustatory responses in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture Res*. 2006;37(9):847–854.

32. Ogawa K., Caprio J. Major differences in the proportion of amino acid fiber types transmitting taste information from oral and extraoral regions in the channel catfish. *J. Neurophysiol.* 2010;103(4):2062–2073.

33. Jiang P., Josue J., Li X., Glaser D., Lia W., Brand J.G., Margolskee R.F., Reed D.R., Beauchamp G.K. Major taste loss in carnivorous mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012;109(13):4956–4961.

34. Zhu K., Zhou X., Xu S., Sun D., Ren W., Zhou K., Yang G. The loss of taste genes in cetaceans. *BMC Evol. Biol.* 2014;14:218.

Поступила в редакцию 21.05.2024

После доработки 28.06.2024

Принята в печать 04.07.2024

RESEARCH ARTICLE

Palatability of organic acids and their derivatives for cichlid fishes (Cichlidae)

A.O. Kasumyan* , A.D. Levina 

Department of Ichthyology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: alex_kasumyan@mail.ru

Taste attractivity of 15 organic acids and their derivatives (ascorbic, citric, sorbic, malic, oxalic, acetic, glycolic, α - and γ -aminobutyric acids, their Na^+ - and K^+ -salts; 0,1 M) was compared for 5 species of cichlid fishes (Cichlidae) – Nile *Oreochromis niloticus* and Mozambique *O. mossambicus* tilapias, golden mbuna *Melanochromis auratus*, lemon cichlid *Neolamprologus leleupi* and tailbar cichlid *Vieja hartwegi*. Citric and oxalic acids, Na^+ -ascorbate, K^+ -sorbate and K^+ -citrate, ammonium oxalate have an attractive or indifferent taste for fish, ascorbic and sorbic acids, Na^+ -citrate and Na^+ -malate have an aversive or indifferent taste. Malic acid has an attractive taste for tailbar cichlid, an aversive taste for Mozambique tilapia and an indifferent taste for other cichlids. Acetic acid and isomers of aminobutyric acid have indifferent taste for all fishes. The taste attractivity of organic acids may be different compared to salts formed on their basis. The attractiveness of salts is higher than that of the corresponding acids in 10 out of 28 cases, lower in 4 cases, and the same in 14 cases. The conversion of ascorbic and sorbic acids into Na^+ and K^+ salts is accompanied by an increase in taste attractivity in most cichlids, malic acid to malate Na^+ – in half of the species. For most fish, citric acid and its Na^+ - and K^+ -salts have similar attractiveness. Oxalic acid, compared with ammonium oxalate, has a higher attractiveness for lemon cichlid, a lower one for Mozambique tilapia and the same taste quality for the other three fish species. There are no differences between the consumption of agar pellets with isomers of aminobutyric acid and pellets with acetic and glycolic (hydroxy acetic) acids in all cichlids. The feeding behavior shown by cichlids during the orosensory testing of pellets is similar – fish perform a small number of rejections and repeated grasps of pellets, the duration of pellet retention time in the oral cavity is similar.

Keywords: chemoreception, taste reception, taste preferences, carboxylic acids, feeding behavior, cichlid fishes

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 24-24-00009.

Сведения об авторах

Касумян Александр Ованесович – докт. биол. наук, зав. кафедрой ихтиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-25; e-mail: alex_kasumyan@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4931-8787>

Левина Александра Дмитриевна – аспирант кафедры ихтиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-25; e-mail: al7_ra@list.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8071-792X>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.846+616.858+612.833.81

Моделирование предсимптомной стадии паркинсоноподобного состояния на животных (грызуны и обезьяны)

Ю.А. Тимошина^{1, 2} , Л.В. Терещенко¹ , О.И. Куликова² ,
Т.Н. Федорова² , А.В. Латанов^{1, *}

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

²Научный центр неврологии, Россия, 125367, г. Москва, шоссе Волоколамское, д. 80

*e-mail: latanov@neurobiology.ru

Исследованы изменения поведения и состояния грызунов и обезьян, наблюдаемые на ранней (предсимптомной) стадии до видимого проявления характерных симптомов при формировании паркинсоноподобного синдрома. На модели паркинсоноподобного синдрома у грызунов, индуцированного хроническим введением низких доз токсина ротенона, исследованы последовательные стадии развития нейropатологических процессов — когнитивные нарушения, развивающиеся с 1–2-й нед. воздействия ротенона, незначительные двигательные нарушения на 3–4-й нед. до возникновения выраженной двигательной дисфункции, а также некоторые биохимические показатели. На модели паркинсоноподобного синдрома у обезьян (*Macaca mulatta*) при хроническом введении низких доз токсина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетра-гидропиридина (МФТП), исследованы характеристики зрительно вызванных саккад при выполнении инструментальной условнорефлекторной задачи. По мере развития МФТП-синдрома выявлено увеличение латентных периодов зрительно вызванных саккад, а также снижение их точности при сохранении устойчивого инструментального поведения. Негативные поведенческие эффекты у грызунов и обезьян, а также биохимические эффекты у грызунов проявлялись на предсимптомной стадии заболевания, что позволяет рассматривать их как ранние маркеры паркинсоноподобного синдрома.

Ключевые слова: модель паркинсонизма, ротенон, МФТП, крысы, мыши C57BL/6, макака-резус, инструментальный рефлекс, саккады

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-8

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) — хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, обусловленное избирательным и необратимым поражением дофамин-продуцирующих нейронов компактной части черной субстанции (кчЧС) среднего мозга и дегенерацией нигростриатного дофаминергического пути [1, 2]. БП является гетерогенным заболеванием с разным периодом начала в жизни организма, симптомами и динамикой развития. Такая гетерогенность обуславливает использование ряда моделей на животных для изучения различных аспектов заболевания. Нейротоксины 6-гидроксидофамин (6-OHDA, 6-hydroxydopamine), 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) и пестицид ротенон наиболее часто используются в фундаментальных научных исследованиях для моделирования паркинсонизма на грызунах и приматах. Каждая из

моделей имеет свои преимущества и ограничения, определяющие целесообразность проведения таких экспериментов и соответствие требований к ним. Понимание различий при моделировании БП у разных животных способствует разработке определенного дизайна экспериментов, а также содержательной интерпретации поведенческих и патофизиологических признаков заболевания. Интеграция результатов, полученных на таких моделях, способствует наиболее полному раскрытию гетерогенности и механизмов БП.

На молекулярном уровне развитие БП связано с избыточной продукцией активных форм кислорода (АФК) и протеолитическим стрессом в дегенерирующих нейронах, митохондриальной дисфункцией, нейровоспалением [3–5].

Клинические симптомы БП включают ряд двигательных нарушений, а именно тремор покоя, ригидность, акинезию и постуральную нестабиль-

ность. Немоторные симптомы значительно опережают проявление двигательных расстройств БП у человека. Период, когда возникают эти симптомы, принято называть премоторной или предсимптомной стадией заболевания [6]. Во время этой фазы нейрпатологический процесс прогрессирует без сопутствующих двигательных проявлений и затрагивает немоторные области мозга: обонятельные луковицы, желудочно-кишечное сплетение, голубое пятно, крупноклеточные отделы ретикулярной формации, миндалевидное тело [7]. Известно, что гипометрия (выполнение движений с амплитудой меньше требуемой для точного позиционирования взора на целевом стимуле) *зрительно вызванных саккад* (ЗВС) и увеличение их *латентных периодов* (ЛП) являются наиболее выраженными и ранними признаками БП у человека [8], а также при развитии МФТП-индуцированного паркинсоноподобного синдрома у обезьян [9]. В недавнем единственном исследовании приведены результаты о снижении амплитуд ЗВС на предсимптомной стадии МФТП-синдрома у обезьян (макак-резусов) [10], и после такой гипометричной ЗВС животные совершали дополнительную (корректирующую) саккаду, чтобы сфокусировать взор на целевом стимуле. Значительное внимание, связанное с изучением и моделированием предсимптомной стадии БП, обусловлено перспективами применения стратегии ранней нейропротекторной терапии. В данной статье мы проведем сравнение трех перспективных моделей ранней стадии развития паркинсоноподобного состояния, вызванного введением токсинов.

1. ИССЛЕДОВАНИЕ НА ГРЫЗУНАХ

Методика

Для моделирования премоторной и моторной стадии паркинсоноподобного состояния на грызунах (крысах и мышах) использовали методику хронического подкожного введения токсина ротенона. Ротенон растворяли в 2%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО) и суспендировали в стерильном подсолнечном масле для инъекций. Введение токсина осуществляли по следующей схеме: крысы ($n = 35$) получали ежедневно 2 мг/кг (объем раствора в среднем 0,3 мл) в течение 18 сут, мыши ($n = 36$) получали ежедневно 4 мг/кг (объем раствора в среднем 0,1 мл) в течение 35 сут. Контрольным животным (по 9 в каждой группе) по этой же временной схеме подкожно вводили стерильное растительное масло с 2% ДМСО в соответствующем объеме.

В разные временные точки часть животных выводилась из эксперимента для оценки ряда биохимических изменений в мозге, а именно синтеза (по количеству положительных по тирозингидроксилазе клеток, ТГ-положительные клетки) и содержания дофамина и его метаболита диоксифенилук-

сусной кислоты (ДОФУК), общей активности антиоксидантной системы мозга (по динамике железоиндуцированной хемилюминесценции) и содержания клеток в кЧЧС. Для исследования динамики развития поведенческих нарушений на протяжении всего эксперимента оценивали показатели пищедобывательного поведения в тесте «челночная камера», количество потребляемой пищи и коэффициент предпочтения сахарозы, тяжесть неврологической симптоматики по модифицированной шкале неврологической симптоматики (modified neurological severity scores, mNSS), скорость подъема по наклонной решетке, силу передних конечностей, двигательную активность в тесте «открытое поле», наличие каталепсии.

В тесте «челночная камера» животных обучали оперантной пищедобывательной задаче совершать переход из одного отсека камеры в другой, а затем подойти к кормушке для получения подкрепления. Переходы в отсеки без подхода к кормушкам не подкрепляли. Тестирование в челночной камере проводили один раз в день в течение 5 мин, по истечении которых отмечали число успешных проб (с подкреплением).

Для оценки статистических различий между показателями использовали метод однофакторного дисперсионного анализа. Результаты отражены средними значениями и стандартной ошибкой.

Результаты

У животных контрольных групп (крысы и мыши) по мере обучения оперантной пищедобывательной задаче в челночной камере отмечали увеличение успешных проб (с подкреплением) начиная с 3-х сут у крыс и 8-х сут у мышей. Так, крысы, которым вводили ротенон, на 3-и сут выполняли меньшее число успешных проб по сравнению с контролем ($0,88 \pm 0,23$ против $6,86 \pm 1,71$, $F(5,39) = 4,98$, $p < 0,01$) и демонстрировали больший ЛП первого подхода к кормушке по сравнению с контролем (98 ± 11 против 9 ± 2 с, $F(5,39) = 3,75$, $p < 0,01$). Мыши на 8-е сут введения ротенона выполняли меньшее число успешных проб по сравнению с контролем ($1,12 \pm 0,45$ против $3,81 \pm 0,23$, $F(1, 144) = 23,05$, $p < 0,05$) без отличий ЛП первого подхода к кормушке. Моторных нарушений в эти же сроки выявлено не было.

Значительное снижение коэффициента предпочтения сахарозы у крыс от $0,92 \pm 0,05$ в контроле до $0,57 \pm 0,12$ при введении ротенона отмечалось на 3-и сут ($F(7,75) = 3,52$, $p < 0,05$). У мышей снижение от $0,80 \pm 0,11$ в контроле до $0,64 \pm 0,10$ при введении ротенона отмечалось только на 17-е сут ($F(1, 142) = 38,12$, $p < 0,05$).

Локомоторная активность животных, оцениваемая в тесте «открытое поле», оказалась значительно ниже у крыс, получавших ротенон, по сравнению с контролем с 4-х сут эксперимента (91 ± 14 против 365 ± 63 см, $F(7,72) = 9,23$, $p < 0,0001$)

и у мышей с 19-х сут (1120 ± 20 против 2985 ± 32 см, $F(1, 204) = 13,14$, $p < 0,001$).

Длительное введение ротенона крысам в дозе 2 мг/кг приводило к появлению первых признаков двигательных нарушений уже на 4-е сут, которые проявлялись в нарушении походки у 27% крыс ($4,13 \pm 0,62$ балла по шкале неврологической симптоматики против $1,43 \pm 0,30$ балла в контроле из 16 возможных), уменьшении количества шагов, выполняемых в степпинг-тесте, у 30% крыс ($12,2 \pm 1,98$ против $16,7 \pm 5,32$ в контроле) и увеличении количества ошибок в тесте «планка» у 47% крыс ($2,53 \pm 0,99$ против $1,43 \pm 0,65$ в контроле). На 6-е сут у всех животных, получавших ротенон, наблюдали значительный неврологический дефицит ($10,4 \pm 1,6$ против $0,8 \pm 0,3$ балла в контроле из 16 возможных, $F(7,82) = 21,38$, $p < 0,0001$).

У мышей ротенон также оказал значительное влияние на моторные функции. Животные начинали проявлять изменения в соответствии с оценкой неврологической симптоматики с 20-х сут, однако в целом не демонстрировали серьезных двигательных изменений вплоть до конца эксперимента – средний балл в конечном тестировании составлял $5,44 \pm 0,38$ против 0 (полное отсутствие нарушений) в контроле ($F(1, 23) = 77,24$, $p < 0,001$) из максимально возможных 16. У животных, получавших ротенон, с 14-х сут увеличивалось время подъема по «наклонной решетке» (52 ± 7 против 19 ± 1 с в контроле, $F(1, 205) = 101,0$, $p < 0,001$).

Введение ротенона оказало значительное влияние на содержание дофамина и его метаболита (на грамм ткани) в мозге крыс, но не мышей. У крыс с 7-х сут отмечалось значительное снижение уровня дофамина по сравнению с контролем ($20,54 \pm 1,94$ против $41,56 \pm 3,84$ нмоль/г соответственно, $F(5,42) = 13,28$, $p < 0,01$), которое продолжалось до конца эксперимента ($11,24 \pm 1,83$ против $41,56 \pm 3,84$ нмоль/г соответственно, $F(5,42) = 13,28$, $p < 0,001$). Также отмечалось значительное повышение уровня метаболита дофамина ДОФУК на 5-е сут ($17,97 \pm 3,65$ против $10,49 \pm 0,62$ нмоль/г в контроле, $F(5,42) = 13,28$, $p < 0,01$). В свою очередь концентрация моноами-

на у мышей, получавших ротенон, не изменилась относительно контрольной группы.

Значительное снижение количества клеток в кЧС у крыс наблюдалось с 3-х сут введения ротенона (120 ± 6 против 170 ± 6 в контроле, $F(4,29) = 24,88$, $p < 0,0001$) и к концу эксперимента составляло 96 ± 6 против 159 ± 12 в контроле ($F(4,29) = 24,88$, $p < 0,0001$). Снижение ТГ-позитивных клеток в кЧС у мышей, получавших ротенон, прогрессировало медленно, и к 5-й нед. их среднее количество составляло $72 \pm 7\%$ от значений контрольной группы ($F(1, 21) = 8,90$, $p < 0,05$).

Регулярное введение ротенона крысам достоверно приводило к снижению ЛП железоиндуцированной хемилюминесценции на 7-е сут (75 ± 7 против 109 ± 11 с в контроле, $F(2,17) = 6,82$, $p < 0,05$) и увеличению максимальной интенсивности хемилюминесценции на 18-е сут (1627 ± 26 против 1541 ± 17 мВ в контроле, $F(2,17) = 8,503$, $p < 0,01$). У мышей данные параметры не изменялись.

Обсуждение

На основе известной модели хронического подкожного введения оптимальной концентрации ротенона – 2 мг/кг [11] Д. Трошевым с соавт. были описаны модели ротенон-индуцированного паркинсоноподобного состояния у крыс [12] и мышей [13], дополненные спектром физиологических и нейрохимических исследований. По результатам исследований показано, что крысы обладают большей чувствительностью к токсину и для формирования паркинсоноподобного состояния им достаточно 18 ежедневных инъекций ротенона в дозе 2 мг/кг, в то время как для мышей необходимо увеличение дозы и сроков введения в два раза – 4 мг/кг в течение 35 сут.

У животных выделены три стадии патологического процесса (таблица). В первую очередь у грызунов происходит нарушение мотивационно детерминированной двигательной активности, оцениваемой в тесте «челночная камера» и развитие ангедонии, проявляющейся в снижении потребления сахарозы. Наблюдаемые нарушения

Таблица

Динамика развития паркинсоноподобной симптоматики у крыс и мышей при введении ротенона

Симптомы	Крысы	Мыши
Нарушение способности к научению: снижение количества успешных проб в оперантной пищедобывательной задаче	3 сут	8–11 сут
Нарушение мелкой моторики: увеличение количества ошибок при ходьбе по планке или по наклонной решетке	4 сут	14 сут
Ангедония: снижение потребления сахарозы	3 сут	17 сут
Гиполокомотия: снижение двигательной активности в открытом поле	4 сут	10 сут
Неврологический дефицит	6 сут	20 сут

когнитивной и мотивационной компонент поведения у грызунов обычно связывают с нарушением функционирования дофаминергических нейронов вентральной области покрышки, однако в настоящих исследованиях не было выявлено снижения числа нейронов в данной области.

Вторая ранняя двигательная стадия начинается с 4-х сут введения ротенона у крыс (кумулятивная доза > 8 мг/кг) и с 14-х сут введения у мышей (кумулятивная доза > 56 мг/кг) и характеризуется нарушениями в тестах «наклонная решетка», «сужающаяся дорожка» и степпинг-тесте, что может отражать повышенную ригидность мышц у животных или снижение координации движений. Однако изменений по шкале неврологической симптоматики и в содержании дофамина в головном мозге на этом этапе не наблюдалось.

Видимое снижение двигательной активности животных, отражающее 3-ю стадию патологии, у крыс возникало уже на 6-е сут введения ротенона (кумулятивная доза > 12 мг/кг), в то время как у мышей — только с 4-й нед. (кумулятивная доза > 76 мг/кг), что выражалось в увеличении баллов по шкале mNSS и значительном нарушении организации движений.

Динамика развития поведенческих нарушений была сопоставлена с гистологическими и нейрохимическими изменениями. У крыс с 3-х сут хронического введения ротенона происходило уменьшение количества окрашенных по методу Ниссля клеток в кЧЧС на 42%, а количество клеток в кЧЧС через 18 сут введения токсина уменьшалось на 44% со снижением содержания дофамина в стриатуме более чем на 70% в конце эксперимента по сравнению с контролем. Однако у мышей снижение количества ТГ-позитивных клеток в кЧЧС в среднем на 28% по сравнению с контрольными животными отмечалось только через 35 сут хронического воздействия ротенона без изменения в содержании моноаминов в стриатуме и префронтальной коре на протяжении всего периода исследования.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ НА ОБЕЗЬЯНАХ

Методика

При формировании МФТП-синдрома у двух самцов макак-резусов (*Macaca mulatta*) в возрасте 8 и 10 лет исследованы амплитудно-временные параметры зрительно вызванных саккад ЗВС [14, 15]. МФТП вводили в дозе 0,2 мг/кг внутримышечно через день (всего 10 инъекций, суммарная кумулятивная доза 2,0 мг/кг). По мере введения токсина общее состояние и поведение обезьян в домашней клетке, а также в приматологическом кресле в экспериментах ежедневно оценивали по специальной балльной шкале, разработанной К. Кларке с соавт. [16]. Шкала основана на совокупной оценке компонентов поведения, раз-

вивающихся при МФТП-синдроме у обезьян, — двигательной активности, брадикинезии, частоте эпизодов застывания, нарушения равновесия, изменения позы, тремора, ухудшении приема пищи, вокализации, дискинезии и стереотипии движений в диапазоне оценок от 0 (отсутствие симптомов) до 20-ти баллов (максимальная суммарная выраженность симптомов) (далее — «шкала», «шкала поведения») [15].

У обезьян предварительно вырабатывали инструментальный условный рефлекс, включающий установку взора на фиксационном стимуле (ФС), предъявляемого в центре поля зрения животных, выполнение ЗВС в направлении целевого стимула (ЦС) и мануальное движение рычагом в ответ на незначительное потемнение ЦС, которое подкрепляли фруктовым соком в объеме 0,2 мл. ЦС предъявляли в одном из 34-х положений в прямоугольной области зрительного поля в пределах $\pm 19,5$ град. по горизонтали и $\pm 13,0$ град. по вертикали относительно ФС. Эксцентриситеты ЦС относительно ФС по разным направлениям составляли 6,5; 9,2; 13,0; 14,4; 18,1; 19,5; 20,4 и 22,9 град. Экспериментальные сессии проводили до начала введения токсина и на следующие сутки после очередной инъекции МФТП. Животные успешно выполняли инструментальную задачу примерно в 1000 и более проб в течение одной сессии как до начала, так и в начальный период введения токсина. Движения одного глаза регистрировали с частотой 500 Гц с пространственным разрешением 0,1 град. с использованием электромагнитного метода (англ., *search-coil*) [17], адаптированного к условиям текущего эксперимента [18]. По мере развития МФТП-синдрома оценивали долю корректных проб при выполнении инструментальной задачи, ЛП ЗВС, их амплитуду, а также амплитуду корректирующих саккад (при наличии). Для оценки влияния различных факторов «кумулятивная доза МФТП» и «эксцентриситет ЦС» на ЛП и амплитуды саккад использовали метод двухфакторного дисперсионного анализа. Результаты отражены средними значениями и стандартной ошибкой.

Результаты

Состояние и поведение обезьян при развитии МФТП-синдрома. По мере введения токсина и развития МФТП-синдрома по общему состоянию и работоспособности обезьян при выполнении инструментальной задачи выделены *предсимптомная* стадия (отсутствие видимых нарушений поведения, оценка по шкале 0 баллов) и *легкая* стадия с незначительным ухудшением состояния обезьян, при котором работоспособность в эксперименте еще не нарушена (оценка состояния 2,5–4,5 балла). Дальнейшие стадии (*средняя* и *тяжелая*) с оценкой выше 4,5 баллов характеризовались существенным ухудшением состояния обезьян и снижением их работоспособности

в эксперименте с отчетливыми симптомами МФТП-синдрома [14].

По мере введения токсина исследована динамика амплитудно-временных параметров ЗВС при развитии МФТП-синдрома. Животные демонстрировали устойчивый инструментальный рефлекс при умеренном уровне мотивации несмотря на инъекции токсина, выполняя в одной экспериментальной сессии до 90% корректных проб в предсимптомной (кумулятивная доза МФТП 0,2–0,8 мг/кг) и легкой (кумулятивная доза до 1,0–1,4 мг/кг) стадиях при развитии МФТП-синдрома.

Латентные периоды ЗВС. При развитии МФТП-синдрома ЛП ЗВС существенно зависели как от тяжести заболевания (по мере возрастания кумулятивной дозы токсина), так и от эксцентриситета ЦС (рис. 1). Методом двухфакторного дисперсионного анализа выявлено высоко достоверное влияние на ЛП ЗВС факторов «кумулятивная доза МФТП» и «эксцентриситет ЦС» ($F_1(7,49) = 10,1$, $p < 0,0001$ и $F_2(7,49) = 9,01$, $p < 0,0001$ соответственно). ЛП ЗВС группировали по эксцентриситетам ЦС, в направлениях которых они выполнялись, – ближние (6,5 и 9,2 град., ЗВСб), средние (13,0 и 14,4 град., ЗВСс) и дальние (18,1, 19,5, 20,4 и 22,9 град., ЗВСд). ЛП ЗВСб увеличивались при кумулятивной дозе 0,2–0,6 мг/кг на предсимптомной стадии, когда видимые поведенческие признаки МФТП-синдрома еще не проявлялись, и продолжали увеличиваться при кумулятивной дозе 0,8–1,0 мг/кг на легкой стадии (рис. 1). ЛП ЗВСс и ЗВСд при кумулятивной дозе 0,2–0,6 мг/кг не изменялись, и необратимое увеличение их ЛП происходило только при дозе 0,8 мг/кг и более.

Увеличение ЛП ЗВС в направлении ЦС всех эксцентриситетов сопровождалось увеличением их стандартных отклонений при кумулятивной дозе токсина 0,8 мг/кг и выше, что подтверждается достоверным влиянием на этот параметр факторов «кумулятивная доза МФТП» и «эксцентриситет ЦС» ($F(1,49) = 7,32$, $p \leq 0,0001$ и $F(2,49) = 2,42$, $p = 0,033$ соответственно). При этом стандартные отклонения ЛП ЗВСб увеличивались примерно в 3 раза, а для ЛП ЗВСс и ЗВСд – только в 1,5 раза.

Точность выполнения ЗВС. При развитии МФТП-синдрома у обезьян [10], как и при болезни Паркинсона у человека [8, 20], отмечается гипометричность ЗВС. В случае неточного позиционирования взора на ЦС животные часто совершали корректирующую саккаду (КС) на ЦС, чтобы заметить его потемнение и выполнить мануальное движение для получения подкрепления. В нормальном состоянии (до введения токсина), а также по достижении легкой стадии МФТП-синдрома частота КС ко всем ЦС составляла немногим более 50% и не зависела от состояния животных. С увеличением эксцентриситета ЦС точность ЗВС снижалась (взор не достигал ЦС), и, соответственно, амплитуды КС увеличивались (рис. 2). Чтобы нивелировать зависимость амплитуд КС от эксцентриситета ЦС, усредненные амплитуды КС были нормированы на соответствующие эксцентриситеты ЦС. По результатам двухфакторного дисперсионного анализа выявлено высоко достоверное влияние на нормированные амплитуды КС факторов «кумулятивная доза МФТП» и «эксцентриситет ЦС» ($F(1,6,42) = 11,72$, $p < 0,0001$ и $F(2,6,42) = 19,19$, $p < 0,0001$ соответственно).

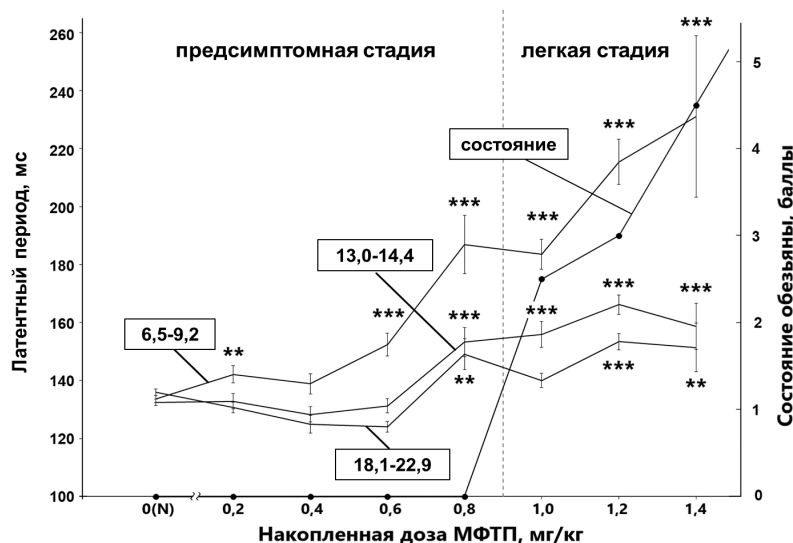


Рис. 1. Зависимость средних значений латентных периодов зрительно вызванных саккад (ось ординат слева) обезьяны от накопленной дозы МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетра-гидропиридина). Данные усреднены по всем саккадам, совершаемым к целевому стимулу трех диапазонов эксцентриситетов – 6,5–9,5; 13,0–14,4 и 18,1–22,9 град. (диапазоны эксцентриситетов обозначены числами). Линия с маркерами отражает оценку состояния обезьяны по шкале поведения (ось ординат справа). Значение «0» на оси абсцисс соответствует нормальному состоянию обезьяны (до начала инъекций МФТП). Разброс данных представлен стандартной ошибкой. Уровни значимости статистических различий при сравнении со значениями в нормальном состоянии: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Так же как для усредненных амплитуд КС была проведена аналогичная нормировка их стандартных отклонений. Увеличение относительных амплитуд КС из-за неточности ЗВС в направлении ЦС всех эксцентриситетов сопровождалось увеличением их нормированных стандартных отклонений при кумулятивной дозе токсина 0,8 мг/кг и выше, что подтверждается достоверным влиянием на этот параметр фактора «кумулятивная доза МФТП» ($F(1(6,42) = 5,40, p \leq 0,0001$). Однако влияние фактора «эксцентриситет ЦС» на нормированные стандартные отклонения оказалось недостоверным $F(2(6,42) = 1,39, p = 0,235$).

В предсимптомной стадии МФТП-синдрома точность ЗВС в направлении ЦС разного эксцентриситета, оцениваемой по амплитудам КС, практически не изменялась по сравнению с нормативными показателями (рис. 2). Но по достижении легкой стадии (при кумулятивной дозе МФТП 1,0–1,4 мг/кг) точность ЗВС достоверно снижалась, что отражалось в увеличении амплитуд КС и их дисперсии после гипометричных ЗВС в направлении ЦС. Следует отметить, что относительные амплитуды КС после неточных ЗВСб оказались больше по сравнению с таковыми для ЗВСс и ЗВСд, а для нормированных стандартных отклонений таких различий не обнаружено. Гипометричность ЗВС, оцениваемая по увеличению относительных амплитуд КС, является характерным предиктором легкой стадии МФТП-синдрома.

Обсуждение

Высокий уровень выполнения инструментального условного рефлекса при развитии МФТП-синдрома у обезьян сохранялся на высоком уровне вплоть до средней стадии заболевания. Ухудшение состояния животных при развитии МФТП-синдрома сопровождалось дефицитом

зрительно-моторной деятельности, состоящем в увеличении ЛП ЗВС и снижении их точности. В начале предсимптомной стадии ЛП увеличивались только у ЗВСб, совершаемых к ЦС, проецирующимся на околоцентральную (парафовеальную) область сетчатки. Предположительно, такие эффекты отражают замедление процессов восприятия, обеспечиваемых парвоцеллюлярной подсистемой зрения [19]. Подобный сенсорный дефицит описан также у пациентов с болезнью Паркинсона [20]. Нам не известны иные работы, демонстрирующие такой эффект МФТП на ЛП ЗВСб у обезьян. При этом ЛП ЗВСс и ЗВСд увеличивались только в начале легкой стадии МФТП-синдрома. Это свидетельствует о различных эффектах функционального дефицита базальных ганглиев, управляющих моторным обеспечением подсистем зрения (дорзальный и вентральный пути) [19]. На основании результатов наших исследований на обезьянах и сведений литературы [10] можно заключить, что по мере развития МФТП-синдрома происходят разные функциональные нарушения глазодвигательного поведения. На предсимптомной стадии замедляются процессы интеграции зрительной информации с подготовкой и инициацией ЗВСб, оцениваемые по их временным характеристикам.

В дальнейшем на легкой стадии МФТП-синдрома нарушаются также исполнительные механизмы, оцениваемые по снижению точности всех ЗВС. Амплитудно-временные характеристики ЗВСб отражают негативную динамику при развитии МФТП-синдрома у обезьян уже на предсимптомной стадии, предвещая дебют видимых поведенческих нарушений, характерных для паркинсоноподобного синдрома. Поэтому увеличение ЛП ЗВСб и снижение их точности являются ранними маркерами заболевания.

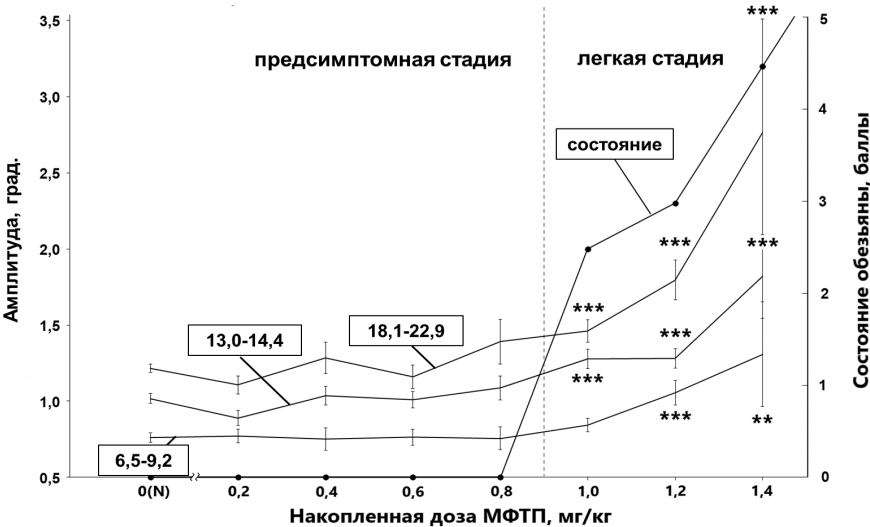


Рис. 2. Зависимость усредненных амплитуд корректирующих саккад (ось ординат слева) обезьяны от накопленной дозы МФТП. Данные усреднены по всем корректирующим саккадам, выполняемым после зрительно вызванных саккад к целевому стимулу трех диапазонов эксцентриситетов. Остальные обозначения см. рис. 1.

Заключение

Ни одна из моделей на животных не имитирует в полной мере нейропатологию БП, и такие модели не могут воспроизвести полный клинический синдром БП у человека. Однако широкое разнообразие моделей на грызунах и приматах (главным образом на макаках) позволяет целенаправленно изучать различные патологические механизмы БП. Отличительные особенности таких моделей могут иметь и практическую значимость в клинике, поскольку клинический диагноз БП отражает гетерогенную группу пациентов с различиями в начале, прогрессировании, симптомах и нейропатологии.

В нейротоксических моделях на грызунах отсутствуют сопоставимые фенотипы БП у человека, что подчеркивают сложность репликации заболевания на животных. Также такие модели не включают немоторные симптомы, существенно влияющие на качество жизни пациентов с БП. Это ставит под сомнение актуальность моделей БП на животных для имитации патологии человека. Однако разработка моделей БП на приматах, которые имеют большее анатомическое, физиоло-

гическое и генетическое сходство с человеком, открывают новые возможности для создания моделей, которые отражают сложную патологию, сходную с таковой у пациентов с БП. Кроме того, модели на грызунах и приматах дают возможность выборочно изучать конкретные аспекты сложной патологии БП. Таким образом, описанные в наших исследованиях модели могут способствовать пониманию механизмов БП и трансляции результатов в диагностику и лечение.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500080-8. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, одобрены комиссией по биоэтике Московского государственного университета (работа с мышами, протокол №82 от 8 июня 2017 года; работа с обезьянами, протокол №43 от 26 октября 2012 года) и комиссией по биоэтике Научного центра неврологии (работа с крысами, протокол №14-7/21 от 10 июля 2021 года). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xia R., Mao Z.H. Progression of motor symptoms in Parkinson's disease. *Neurosci. Bull.* 2012;28(1):39–48.
2. Schiesling C., Kieper N., Seidel K., Krüger R. Familial Parkinson's disease-genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2008;34(3):255–271.
3. Sian J., Dexter D.T., Lees A.J., Daniel S., Agid Y., Javoy-Agid F., Jenner P., Marsden C.D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.* 1994;36:348–355.
4. Rodriguez M., Morales I., Rodriguez-Sabate C., Sanchez A., Castro R., Brito J.M., Sabate M. The degeneration and replacement of dopamine cells in Parkinson's disease: the role of aging. *Front. Neuroanat.* 2014;8:80.
5. Segura-Aguilar J., Paris I., Muñoz P., Ferrari E., Zecca L., and Zucca F.A. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2014;129(6):898–915.
6. Tolosa E., Compta Y., Gaig C. The premotor phase of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2007;310(1–2):S2–S7.
7. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 2003;24(2):197–211.
8. Pretegeani E., Optican L.M. Eye movements in Parkinson's Disease and inherited parkinsonian syndromes. *Front. Neurol.* 2017;8:592.
9. Schneider J.S., Kovelowski C.J. Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. *Brain Res.* 1990;519(1):122–128.
10. Ma W., Li M., Wu J., Zhang Z., Jia F., Zhang M., Bergman H., Li X., Ling Z., Xu X. Multiple step saccades in simply reactive saccades could serve as a complementary biomarker for the early diagnosis of Parkinson's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2022;14:912967.
11. Zhang ZN, Zhang JS, Xiang J, Yu ZH, Zhang W, Cai M, Li XT, Wu T, Li WW, Cai DF. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Res.* 2017;1655:104–113.
12. Troshev D., Berezhnoy D., Kulikova O., Abaimov D., Muzychuk O., Nalobin D., Stvolinsky S., Fedorova T. The dynamics of nigrostriatal system damage and neurobehavioral changes in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull.* 2021;73:1–13.
13. Troshev D., Voronkov D., Pavlova A., Abaimov D., Latanov A., Fedorova T., Berezhnoy D. Time course of neurobehavioral disruptions and regional brain metabolism changes in the rotenone mice model of Parkinson's disease. *Biomedicines.* 2022;10(2):466.
14. Терещенко Л.В., Латанов А.В. Нарушения зрительно-моторных функций при развитии МФТП-индуцированного паркинсоноподобного синдрома у обезьян. *Журн. высш. нервн. деят.* 2018;68(4):496–513.
15. Tereshchenko L.V., Anisimov V.T., Shul'govsky V.V., Latanov A.V. Early changes of saccade parameters in monkeys at the developments of MPTP-induced hemiparkinsonism. *Perception.* 2015;44(8–9):1054–1063.
16. Clarke C.E., Sambrook M.A., Mitchell I.J., Crossman A.R. Levodopa induced dyskinesia and response fluctuations in primates rendered Parkinsonian with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *J. Neurol. Sci.* 1987;78(3):273–280.
17. Robinson D.A. A method of measuring eye movement using a scleral search coil in a magnetic field. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1963;10(4):137–145.
18. Терещенко Л.В., Кузнецов Ю.Б., Латанов А.В., Шульговский В.В. Методика хронической электромаг-

нитной регистрации движений глаз и головы у обезьян. *Журн. высш. нерв. деят.* 2000;50(5):889–894.

19. Mishkin M., Ungerleider L.G., Macko K.A. Object vision and spatial vision: two cortical pathways. *Trends Neurosci.* 1983;6(10):414–417.

20. Ратманова П.О., Напалков Д.А., Богданов Р.Р., Латанов А.В., Турбина Л.Г., Шульговский В.В. Влияние

дефицита дофамина на процесс подготовки зрительно-вызванных саккадических движений глаз. *Журн. высш. нерв. деят.* 2006;56(5):590–596.

Поступила в редакцию 26.04.2024

После доработки 24.06.2024

Принята в печать 04.07.2024

RESEARCH ARTICLE

Modeling the pre-symptomatic stage of hemi-parkinsonian state in animals (rodents and monkeys)

Yu.A. Timoshina^{1, 2} , L.V. Tereshchenko¹ , O.I. Kulikova² ,
T.N. Fedorova² , A.V. Latanov^{1, *} 

¹Department of Neurobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Research Center of Neurology, Volokolamskoye sh. 80, Moscow, 125367, Russia

*e-mail: latanov@neurobiology.ru

The behavioral and functional states preceding the onset specific parkinsonian symptoms were studied at an early (*pre-symptomatic*) stage of hemi-parkinsonian syndrome development in rodents and monkeys. The *pre-symptomatic* stage of the hemi-parkinsonian syndrome was determined in rodents (mice and rats) treated by chronic administration of low doses of rotenone toxin. The consecutive steps of neuropathological traits development in rodents included the cognitive impairment at the 1st-2nd week of exposure to rotenone, minor movement disorders at the 3rd-4th week before the onset of severe motor dysfunction as well as some biochemical indicators. The latencies and amplitudes of visually guided saccades (VGS) while conditioned instrumental task performing were studied in nonhuman primates (*Macaca mulatta*) chronically treated with low doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). The elongation of VGS latencies and the decline of their accuracy were revealed with development of MPTP-induced syndrome but conditioned instrumental performance was not affected. The negative behavioral effects manifested in animals at the *pre-symptomatic* stage of toxins induced disease both in the rotenone model in rodents and in MPTP model in monkeys suggesting them as early markers of a hemi-parkinsonian syndrome.

Keywords: Parkinsonism modelling, rotenone, rat, mice C57Bl/6, neurotoxin MPTP, *Macaca mulatta*, instrumental conditioning, saccade

Funding: The research was supported by the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University №121032500080-8

Сведения об авторах

Тимошина Юлия Анатольевна — аспирант кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ, мл. науч. сотр. лаб. экспериментальной и трансляционной нейробиологии Института мозга Научного центра неврологии. Тел.: 8-495-939-37-38; e-mail: timoshina.yu.a@neurology.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0546-8767>

Терещенко Леонид Викторович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-37-38; e-mail: lter@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9110-8946>

Куликова Ольга Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. экспериментальной и трансляционной нейробиологии Института мозга Научного центра неврологии. Тел.: 8-495- 374-77-76; email: kulikova@neurology.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1129-6033>

Федорова Татьяна Николаевна — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. экспериментальной и трансляционной нейробиологии Института мозга Научного центра неврологии. Тел.: 8-495-374-77-76; email: fedorova@neurology.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0483-1640>

Латанов Александр Васильевич — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-37; e-mail: latanov@neurobiology.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7388-3914>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 591.112.1

Механизмы воздействия полиароматических углеводородов нефти на электрическую активность сердца северной наваги (*Eleginus nawaga*)

Т.С. Филатова^{1,2,*} , А.С. Бородков³ , А.М. Кархов^{1,2} , И.Х. Джуманиязова¹ ,
О.Б. Пустовит¹ , Д.В. Абрамочкин¹

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

²Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а;

³Институт геохимии и аналитической химии имени В.И. Вернадского, Российская академия наук, Россия, 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 19, стр. 1

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

Интенсивное развитие нефте- и газодобывающей отраслей в Арктике ставит под угрозу арктические водные экосистемы. Считается, что токсическое и, прежде всего, летальное кардиотоксическое действие нефти на живые организмы связано с полиароматическими углеводородами (ПАУ), и в предыдущих работах были рассмотрены электрофизиологические механизмы действия отдельных ПАУ в составе нефти. Однако физиологические эффекты сложной смеси ПАУ в составе водорастворимой фракции (ВРФ) нефти ранее не изучались. Данное исследование сфокусировано на анализе действия ВРФ нефти на электрическую активность и основные ионные токи в рабочем миокарде наваги (*Eleginus nawaga*), одного из наиболее важных промысловых видов рыб Арктики. Было обнаружено, что 1%-ные и 10%-ные растворы ВРФ нефти вызывают выраженное увеличение длительности потенциалов действия в кардиомиоцитах наваги. Этот эффект, по всей видимости, связан с подавлением быстрого тока задержанного выпрямления I_{Kr} (IC_{50} около 3% в желудочковом и предсердном миокарде). В более высоких концентрациях ВРФ нефти подавляла и кальциевый ток I_{CaL} ($IC_{50} = 10,6\%$), что приводило к снижению сократительной активности изолированных препаратов миокарда. В отличие от отдельных трициклических ПАУ, ВРФ нефти не действовала на быстрый натриевый ток I_{Na} и не влияла на скорость фазы быстрой деполяризации потенциала действия. Оценка содержания трициклических ПАУ в 10%-ной ВРФ нефти показала, что их совокупная концентрация относительно низка и не превышает 100 нМ. Таким образом, ВРФ нефти также оказывает мощное кардиотоксическое действие в миокарде рыб, однако ее эффект отличается от исследованных ранее эффектов трициклических ПАУ и позволяет предполагать присутствие в составе нефти еще не исследованных соединений, обладающих более выраженной способностью блокировать калиевые каналы ERG.

Ключевые слова: кардиомиоцит, потенциал действия, пэтч-кламп, полиароматические углеводороды, ионные токи, нефть

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-9

Введение

Одной из ключевых задач, стоящих перед нашей страной в текущем столетии, является успешное хозяйственное освоение обширных пространств Русской Арктики. Минеральные ресурсы Арктики, в первую очередь, запасы нефти и газа велики, и их неизбежное освоение представляется делом грядущих десятилетий. Вместе с тем, при реализации проектов экономического развития

Арктики важно детальное понимание имеющихся рисков для хрупких арктических экосистем с целью минимизации возможных негативных экологических последствий. В частности, с губительным воздействием утечек нефтепродуктов на морские экосистемы уже столкнулись как другие страны, в первую очередь, США, так и, в определенной степени, Россия. Например, в 1989 г. авария американского танкера Exxon Valdez у берегов

Аляски привела к утечке в океан более 40 тыс. т. сырой нефти. В 2010 г. взрыв и пожар нефтяной платформы Deepwater Horizon в Мексиканском заливе привели к самому масштабному в истории выбросу нефти в море — ежедневная утечка нефти составляла несколько тысяч тонн. До сих пор масштабного загрязнения вод Северного ледовитого океана нефтепродуктами удавалось не допускать, однако увеличение рисков подобного загрязнения в будущем представляется весьма вероятным. Более того, существуют опасения, что загрязнители, накопившиеся за прошедшие годы в вечной мерзлоте, смогут попасть в океан вследствие потепления климата [1]. Наконец, общая интенсификация деятельности человека в Арктике увеличивает уровень постоянных небольших утечек нефтепродуктов, которые в совокупности могут приводить к последствиям, сравнимым с разовыми крупными выбросами.

Известно, что рыбы характеризуются высокой чувствительностью к загрязнителям, содержащимся в нефтепродуктах, причем наиболее уязвимой в отношении острых эффектов загрязнителей в организме рыбы считается сердечно-сосудистая система [2]. Основными компонентами нефти, оказывающими токсическое воздействие, являются полиароматические углеводороды (ПАУ), обладающие относительно высокой растворимостью в воде [3]. В настоящее время известно, что загрязнение среды обитания рыб сырой нефтью приводит к нарушению как электрической, так и сократительной активности в мышечных клетках сердца, кардиомиоцитах, а значит, и в целом сердце. В частности, было показано, что экстракты сырой нефти с платформы Deepwater Horizon вызывали нарушение кальциевого обмена и удлинение потенциала действия (ПД) в кардиомиоцитах тунца, сопряженное с подавлением быстрого калиевого тока задержанного выпрямления I_{Kr} [4]. Дальнейшие исследования были в основном сосредоточены на кардиотоксическом действии одного из содержащихся в нефти ПАУ — фенантрена [5–7]. В отличие от перечисленных исследований, работы нашей группы проводятся на рыбах Арктики. В частности, мы показали, что действие как фенантрена [8], так и другого трициклического ПАУ, флюорена [9], на электрическую активность сердца северной наваги обусловлено подавлением I_{Kr} и — в меньшей степени — быстрого натриевого тока I_{Na} и кальциевого тока L-типа I_{CaL} .

В то же время, действие всей совокупности ПАУ, содержащихся в российских сортах нефти, на ионные токи и электрическую активность кардиомиоцитов арктических видов рыб ранее не было исследовано. В данной работе впервые описаны изменения электрической активности желудочковых миоцитов северной наваги под действием водорастворимой фракции (ВРФ) нефти и раскрыты их ионные механизмы.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты проводили на базе Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова МГУ имени М.В. Ломоносова. Взрослых особей наваги (*Eleginus nawaga*) вылавливали в Кандалакшском заливе в окрестностях биостанции (66°19'50" с.ш., 33°40'06" в.д.); в работе использовали животных обоих полов массой 50–150 г. Перед экспериментами животных содержали в течение минимум 7 сут в аквариуме, оборудованном проточной системой (водообмен ~3 л/мин). Температуру воды в аквариуме для передержки контролировали, средняя температура — 10°C. Проведение экспериментов было одобрено комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (разрешение №164-ж).

Получение изолированных кардиомиоцитов. Изолированные кардиомиоциты наваги получали стандартным, ранее описанным способом, посредством энзиматической обработки изолированного сердца [10, 11]. Рыбу оглушали ударом по голове, после чего разрушали головной мозг, вскрывали с брюшной стороны и вырезали сердце. В желудочек сердца через бульбус аорты вставляли канюлю и ретроградно перфузировали сердце раствором для выделения миоцитов со сниженным содержанием Na^+ и не содержащим ионов Ca^{2+} [12]. Состав раствора (мМ): 100 — NaCl; 10 — KCl; 1,2 — $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; 4 — $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 50 — таурин; 10 — глюкоза; 10 — HEPES; pH — 6,9 при комнатной температуре (22°C). Через 5 мин перфузии подавали раствор такого же состава с добавлением протеолитических ферментов — коллагеназы IA (Sigma, США) и трипсина (Sigma, США) в концентрациях 0,5 и 0,33 мг/мл соответственно, а также 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Через 8–10 мин энзиматической перфузии желудочек отделяли от предсердия, измельчали ножницами и пипетировали полученную массу для механического разделения кардиомиоцитов. Суспензию миоцитов хранили в растворе для выделения при температуре 5°C в течение 8–9 ч после выделения.

Получение водорастворимой фракции нефти. Водорастворимую фракцию нефти (ВРФ), содержащую токсичные полициклические углеводороды, получали ранее описанным способом [13]. В работе использовали западносибирскую нефть марки Urals. Нефть добавляли к используемому в эксперименте физиологическому раствору в соотношении 1 г нефти на 1 л раствора. Затем нефть эмульгировали в растворе с помощью блендера, а полученную эмульсию помещали в делительную воронку на 1 ч. По прошествии 1 ч нижние 50% объема делительной воронки сливали и использовали в качестве ВРФ нефти. В экспериментах тестировали 0,1%, а также 1% и 10% разведения ВРФ нефти.

Регистрация ионных токов и потенциалов действия. Ионные токи и потенциалы действия (ПД)

регистрировали в изолированных кардиомиоцитах наваги методом пэтч-кламп в конфигурации whole cell с помощью усилителя Axopatch 200A (Molecular Devices, США). При записи ионных токов и потенциалов действия использовали, соответственно, режим фиксации потенциала (voltage clamp) или фиксации тока (current clamp). Клетки помещали в экспериментальную камеру RC-26 объемом 150 мкл (Warner Instrument Corporation, США) и постоянно перфузировали модифицированным физиологическим раствором следующего состава (в мМ): 150 – NaCl; 5,4 – KCl; 1,8 – CaCl₂; 1,2 – MgCl₂; 10 – глюкоза; 10 – Hepes; pH – 7,6, при температуре 12°C. Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров (Sutter Instruments, США). Для регистрации калиевых токов пипетки заполняли раствором (pH 7,2) следующего состава (мМ): 140 – KCl; 1 – MgCl₂; 5 – EGTA; 4 – MgATP; 0,03 – Na₂GTP₃; 10 – Hepes. Сопротивление заполненных пэтч-пипеток составляло в среднем $2,36 \pm 0,24$ МΩ.

При регистрации тока I_{Kr} в физиологический раствор добавляли нифедипин (20 мкМ; Sigma-Aldrich, США) и тетродотоксин (300 нМ; Sigma-Aldrich, США) для подавления токов I_{CaL} и I_{Na} соответственно. I_{Kr} индуцировали двухступенчатой деполяризацией от поддерживаемого потенциала –80 мВ. На первой ступени (длительность – 2 с) клетку деполяризовали до –40 – +60 мВ с шагом 20 мВ (всего 6 шагов) для того, чтобы вызвать активацию калиевых каналов ERG. Вторую ступень –20 мВ использовали для регистрации хвостового тока. При регистрации калиевого тока входящего выпрямления I_{K1} помимо указанных блокаторов добавляли E-4031 (5 мкМ; Sigma-Aldrich, США), блокатор I_{Kr} . Ток индуцировали линейным сдвигом потенциала от +60 до –120 мВ (длительность сдвига – 1 с), поддерживаемый потенциал составлял –80 мВ.

Для регистрации ПД использовали модифицированный физиологический раствор того же состава, что и выше, а также пипеточный раствор для регистрации калиевых токов без добавления EGTA (этиленгликоль-бис (β-аминоэтиловый эфир) -N,N,N',N'-тетрауксусная кислота) [14]. ПД индуцировали в режиме фиксации тока импульсами деполяризующего тока длительностью 2 мс, с частотой 0,5 Гц, амплитуду импульсов устанавливали на уровне на 30% превышающем пороговую, достаточную для инициации ПД [15]. Оценивали влияние ВРФ нефти на длительность ПД на уровне 50% (ДПД50) и 90% (ДПД90) реполяризации, уровень мембранного потенциала покоя и максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД.

Кальциевый ток I_{Ca} регистрировали с использованием модифицированного физиологического раствора, в котором KCl был заменен эквивалентным количеством CsCl. Пипеточный раствор для

регистрации кальциевого тока содержал (в мМ): 130 – CsCl; 1 – MgCl₂; 5 – EGTA; 10 – тетраэтиламмония; 4 – MgATP; 0,03 – Na₂GTP и 10 – Hepes, pH – 7,2 доведенный с помощью CsOH. Ток индуцировали ступенчатой деполяризацией с шагом 10 мВ от поддерживаемого потенциала –40 мВ, позволяющего инактивировать натриевые каналы. При регистрации быстрого натриевого тока (I_{Na}) использовали физиологический раствор с пониженным содержанием натрия (мМ): 20 – NaCl; 120 – CsCl; 1 – MgCl₂; 0,5 – CaCl₂; 10 – глюкоза; 10 – Hepes; pH – 7,6. Для подавления I_{Ca} в раствор добавляли 20 мкМ нифедипина. Пипеточный раствор для регистрации I_{Na} содержал (мМ): 5 – NaCl; 130 – CsCl; 1 – MgCl₂; 5 – EGTA; 5 – Mg₂ATP; 5 – Hepes, pH – 7,2. Регистрацию I_{Na} начинали не ранее, чем через 3 мин после установления конфигурации whole-cell. Ток индуцировали ступенчатой деполяризацией с шагом 10 мВ от поддерживаемого потенциала –120 мВ.

Регистрация сократительной активности предсердного миокарда. Для изучения влияния ВРФ нефти на сократительную активность предсердного миокарда использовали механочувствительный датчик (Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, Германия), регистрирующий сокращения в изометрическом режиме. Сердце наваги промывали от крови физиологическим раствором, а затем выделяли препарат изолированного предсердия с интактным пейсмейкером (синоатриальный клапан). Препарат закрепляли в экспериментальной термостатируемой камере, заполненной физиологическим раствором Кребса, содержащим (мМ): 150,1 – NaCl, 7 – NaHCO₃, 5,2 – KCl, 1,9 – NaH₂PO₄·2H₂O, 1,8 – MgSO₄·7H₂O, 1,9 – CaCl₂, 5,6 – D-глюкоза. В ходе эксперимента раствор в камере постоянно аэрировали карбогеном (95% O₂, 5% CO₂) для оксигенации и поддержания pH. Препарат закрепляли на дне камеры и подсоединяли к механодатчику. Силу сокращений, развиваемую препаратом, нормировали на массу препарата. Оценивали частоту сокращений препаратов, амплитуду сокращений, а также максимальную скорость развития сокращений и скорость расслабления препаратов.

Определение содержания полиароматических углеводородов в ВРФ нефти. Концентрация фенантрена и его производных была измерена методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии на масс-спектрометре с электронной ионизацией Маэстро-αМС (Интерлаб, Россия). Ароматические углеводороды выделяли из водного раствора методом капельной микроэкстракции. В качестве внешнего стандарта использовался 3-метилфенантрен.

Анализ данных. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего от *n* клеток. Статистическую обработку данных производили с использованием программного обеспече-

ния GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для оценки нормальности распределения данных использовали тест Шапиро-Уилка. В зависимости от эксперимента, для оценки статистической значимости различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для связанных или несвязанных выборок с апостериорным тестом Даннетта. Для оценки значимости воздействия ВРФ нефти на I_{CaL} использовали однофакторный ANOVA (смешанная модель). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В первую очередь были исследованы изменения в конфигурации электрической активности (ПД) желудочкового миокарда наваги под действием ВРФ нефти (рис. 1А). ВРФ в концентрации 0,1% не вызвала статистически значимых изменений каких-либо из измеряемых параметров электрической активности (рис. 1Б–Д). Как 1%, так и 10% ВРФ нефти вызвали замедление реполяризации, выражавшееся в статистически значимом увеличении ДПД50 (рис. 1Г) и ДПД90 (рис. 1Д). Данный эффект полностью развивался за 4 мин воздействия ВРФ нефти. Ни одна из протестированных концентраций ВРФ нефти не влияла на уровень мембранного потенциала покоя (рис. 1Б). Максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД имела тенденцию к снижению под действием 10% ВРФ нефти, однако эти изменения не достигали уровня статистической значимости (рис. 1В). Таким образом, основным эффектом ВРФ нефти в отношении электрической активности желудочковых миоцитов являлось замедление реполяризации. На следующем этапе исследования мы изучили воздействие ВРФ нефти на основные ионные токи в кардиомиоцитах наваги, особое внимание уделив быстрому калиевому току задержанного выпрямления I_{Kr} , фоновому току входящего выпрямления I_{K1} и кальциевому току I_{Ca} , соотношение вклада которых определяет скорость реполяризации и длительность ПД в кардиомиоцитах рыб. Еще один реполяризующий ток — медленный калиевый ток задержанного выпрямления I_{Ks} , характерный для кардиомиоцитов млекопитающих, птиц [16] и некоторых других позвоночных [17], — отсутствует у наваги [18].

Поскольку I_{Kr} является основным реполяризующим током в кардиомиоцитах рыб [17], его чувствительность к ВРФ нефти оценивали не только в желудочковых, но и в предсердных миоцитах. ВРФ нефти во всех трех протестированных концентрациях вызвала статистически значимое снижение амплитуды I_{Kr} (рис. 2). Эффект наблюдался при всех позитивных значениях поддерживаемого потенциала (рис. 2Б). Чувствительность I_{Kr} к действию ВРФ нефти практически не различалась в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах (рис. 2В, Г). Расчетная концентрация полу-

максимального ингибирования IC_{50} составила 3,5% ВРФ нефти для предсердных и 3,2% для желудочковых миоцитов. Таким образом, ВРФ нефти оказывает мощное блокирующее воздействие на каналы ERG в рабочих кардиомиоцитах наваги. Другой реполяризующий ток, I_{K1} , напротив оказался совершенно нечувствителен к действию ВРФ нефти. Даже 10% ВРФ нефти не вызвала изменений в амплитуде как выходящей, так и входящей компоненты I_{K1} , что вполне согласуется с данными, полученными ранее на миоцитах наваги для отдельных ПАУ в составе нефти, фенантрена и флюорена [8, 9].

Деполаризующие токи, в целом, оказались менее чувствительны к воздействию ВРФ нефти по сравнению с I_{Kr} . Даже в концентрации 10% ВРФ нефти не вызвала достоверных изменений величины быстрого натриевого тока I_{Na} в желудочковых миоцитах наваги (рис. 3А, Б).

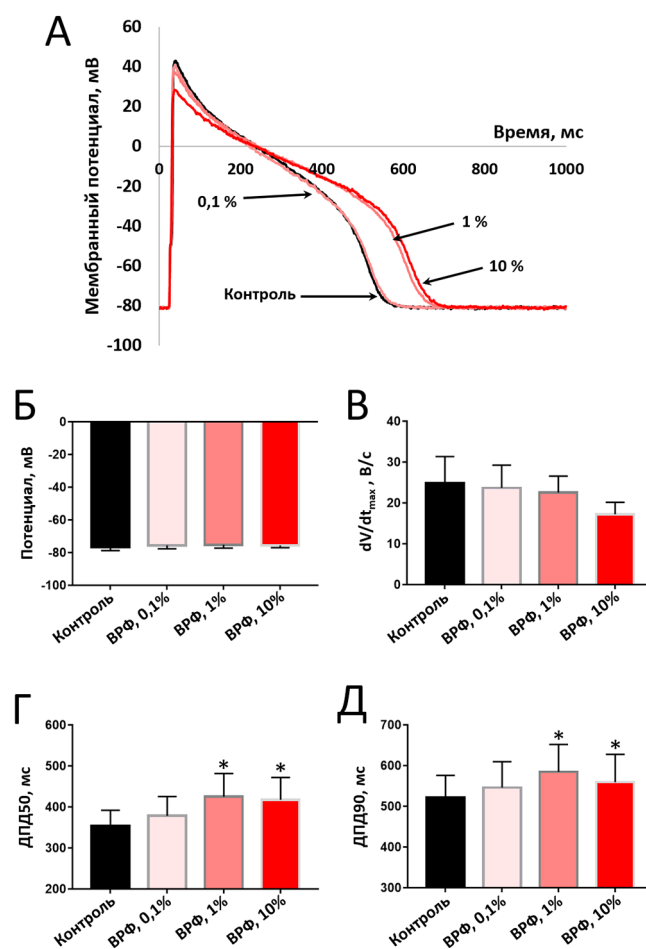


Рис. 1. Влияние ВРФ нефти на конфигурацию потенциала действия (ПД) в изолированных желудочковых миоцитах наваги. А — репрезентативные записи ПД в контрольных условиях, и под действием 0,1%, 1 и 10% ВРФ нефти. Б–Д — влияние ВРФ нефти на основные параметры конфигурации ПД ($n = 8$): уровень мембранного потенциала покоя (Б), максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД (В), длительность ПД на уровне 50% (Г) и 90% (Д) реполяризации. * — значимое отличие от контрольного значения, однофакторный RM-ANOVA с апостериорным тестом Даннетта, $p < 0,05$.

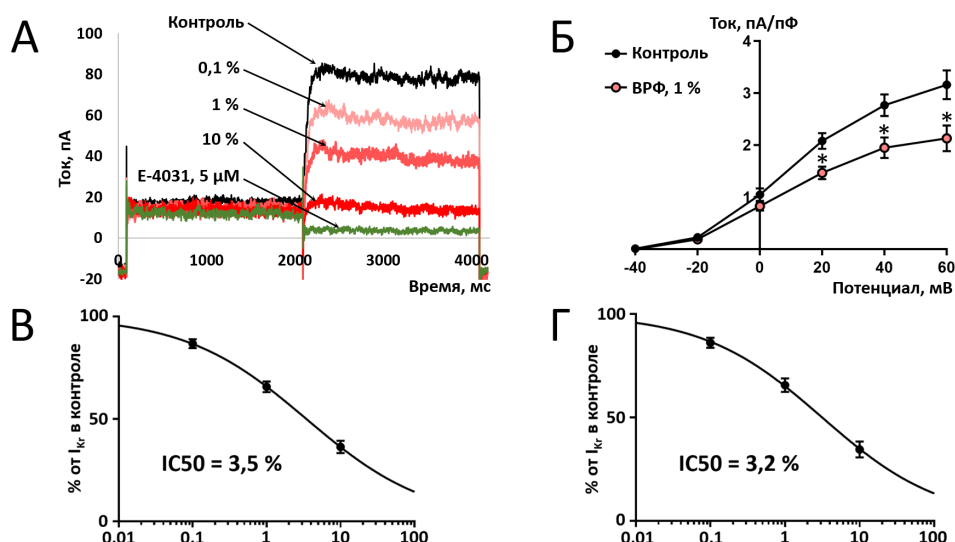


Рис. 2. Влияние ВРФ нефти на быстрый калиевый ток задержанного выпрямления I_{Kr} . А – репрезентативные записи I_{Kr} в предсердном миоците наваги в контрольных условиях и в присутствии 0,1%, 1% и 10% ВРФ. Ток индуцировали с помощью двухступенчатой деполяризации (до +40 и –20 мВ) от поддерживаемого потенциала –80 мВ. Также показана запись в присутствии блокатора тока I_{Kr} E-4031 (5 μM). Б – вольт-амперные характеристики I_{Kr} в контроле и на фоне действия 1% ВРФ в желудочковых миоцитах наваги (n = 9). * – значимые различия, парный t-тест, $p < 0,05$. В, Г – кривые концентрация-эффект для подавления ВРФ нефти I_{Kr} в предсердных (В, n = 10) и желудочковых (Г, n = 9) миоцитах наваги. Эффект всех трех концентраций статистически значим; для сравнения абсолютных значений I_{Kr} использовали однофакторный ANOVA (смешанная модель) с апостериорным тестом Даннетта, $p < 0,05$.

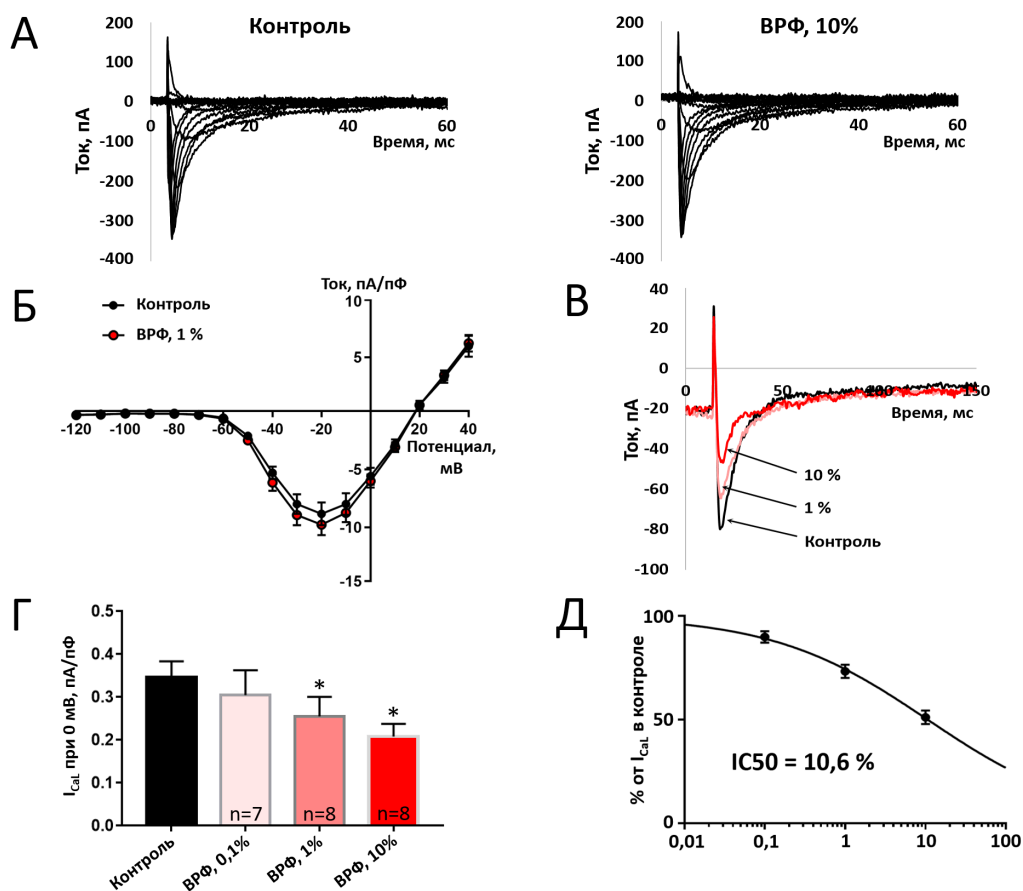


Рис. 3. Влияние 10% ВРФ нефти на токи I_{Na} и I_{Ca} в желудочковых миоцитах наваги. А – I_{Na} в желудочковом миоците наваги в контрольных условиях (слева) и на фоне действия 10% ВРФ нефти (справа). Ток индуцировали деполяризацией от поддерживаемого потенциала –120 мВ с шагом 10 мВ. Б – вольт-амперные характеристики I_{Na} в контроле и на фоне действия 10% ВРФ (n = 8). Достоверных различий нет, парный t-тест, $p > 0,05$. В – I_{Ca} в желудочковом миоците наваги в контроле и на фоне действия 1% и 10% ВРФ нефти. Ток индуцировали деполяризацией от поддерживаемого потенциала –40 мВ до 0 мВ. Г – амплитуда I_{Ca} в контрольных условиях и в присутствии ВРФ нефти. * – достоверное отличие от контрольных значений; для сравнения абсолютных значений I_{Ca} использовали однофакторный ANOVA (смешанная модель), $p < 0,05$. Д – кривая концентрация-эффект подавления тока I_{Ca} , индуцированного деполяризацией до 0 мВ, в желудочковых миоцитах наваги под действием ВРФ нефти (n указано в пункте Г).

В экспериментах с регистрацией I_{Ca} подачу ВРФ нефти начинали не ранее, чем через 4 мин после установления конфигурации whole-cell, в течение которых амплитуда тока постепенно снижается и выходит на постоянный стабильный уровень (run-down) из-за постепенного вымывания цАМФ из клетки в ходе эксперимента [19]. ВРФ нефти в концентрации 0,1% не вызвала статистически значимых изменений амплитуды I_{Ca} . В концентрациях 1% и 10% ВРФ значимо снижала амплитуду I_{Ca} при поддерживаемом потенциале 0 мВ (рис. 3В, Г). Расчетная концентрация IC_{50} для подавления тока I_{Ca} под действием ВРФ нефти составила 10,6%. Таким образом, полученные данные указывают на практически полную нечувствительность I_{Na} и умеренную чувствительность I_{Ca} к использованным в эксперименте концентрациям ВРФ нефти.

Поскольку снижение амплитуды I_{Ca} и, соответственно, входа кальция в кардиомиоциты наваги под действием ВРФ нефти потенциально может приводить к подавлению сократительной активности миокарда и насосной функции сердца, на заключительном этапе работы мы изучили действие ВРФ нефти в концентрации 10% на сократительную активность изолированных препаратов предсердного миокарда наваги. ВРФ нефти вызвала значимое снижение амплитуды сокращений (рис. 4) почти на 10% от силы сокращений препаратов в контрольных условиях. Эффект развивался быстро, в течение 20–30 с после аппликации ВРФ (рис. 4А), однако затем происходило постепенное ослабление наблюдаемого эффекта и к 10 мин после аппликации параметры сократительной активности препаратов возвращались к исходным значениям (рис. 4Б). Достоверных

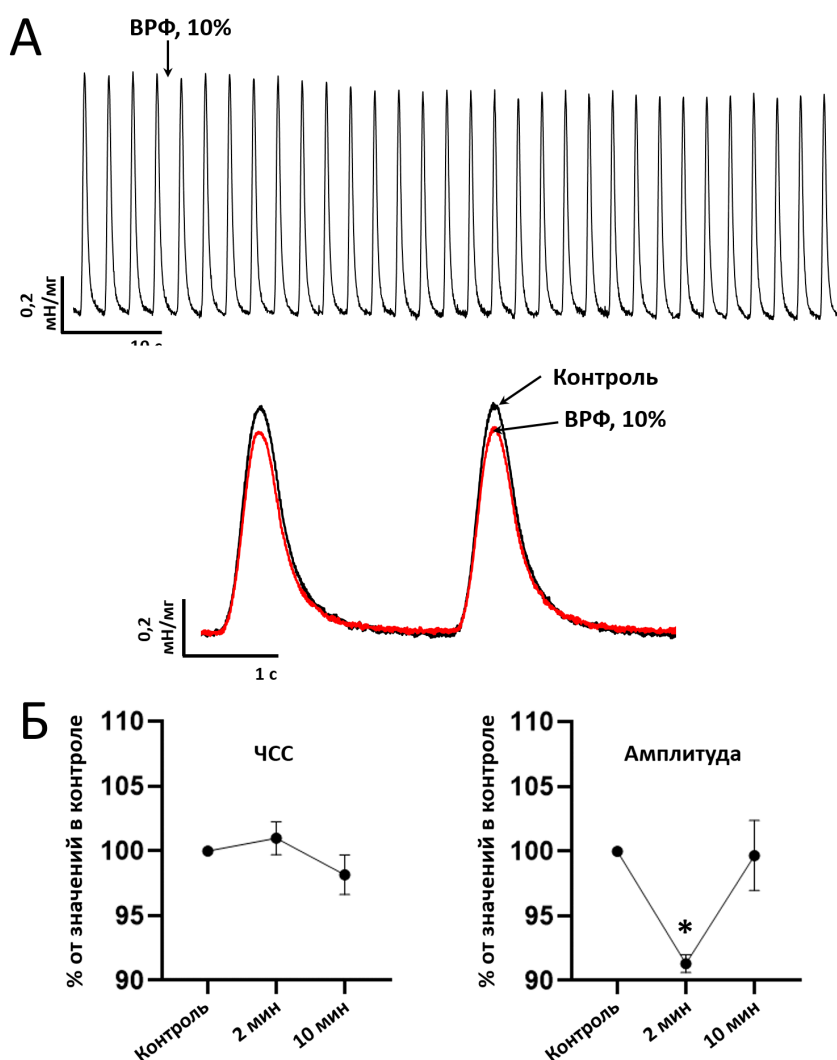


Рис. 4. Влияние 10% ВРФ нефти на сократительную активность препаратов изолированного предсердия наваги, работающих в собственном ритме. А — оригинальная запись сократительной активности во время добавления ВРФ нефти в экспериментальную камеру, момент добавления ВРФ обозначен стрелкой. Внизу — сопоставление двух начальных и двух конечных сокращений из этого фрагмента записи при более быстрой развертке. Б — относительные частота сердечных сокращений и амплитуда сокращений препаратов во время максимального развития эффекта ВРФ нефти (2 мин после добавления в камеру) и через 10 мин после добавления ВРФ нефти ($n = 6$). * — значимые отличия соответствующих абсолютных значений параметров от контрольных абсолютных значений, однофакторный RM-ANOVA с апостериорным тестом Даннетта, $p < 0,05$.

изменений других параметров, в т.ч. частоты сокращений препаратов, обнаружено не было. 1% ВРФ нефти в нескольких тестовых экспериментах не вызвала статистически значимых изменений в сократительной активности препаратов. Таким образом, 10% ВРФ нефти оказывает в миокарде наваги негативный инотропный эффект, имеющий транзиторный характер. Относительно слабый и кратковременный эффект, по всей видимости, может быть объяснен наличием дополнительного диффузионного барьера в тканевом препарате миокарда по сравнению с изолированными кардиомиоцитами.

Итак, среди исследованных 4 основных ионных токов в желудочковых кардиомиоцитах наваги наибольшую чувствительность к действию ВРФ нефти показал быстрый ток задержанного выпрямления I_{Kr} ($IC_{50} = 3,2\%$). Существенно менее чувствителен оказался кальциевый ток I_{Ca} ($IC_{50} = 10,6\%$), а I_{Na} и I_{K1} оказались нечувствительны к действию ВРФ нефти. Эти результаты хорошо согласуются с выявленным влиянием ВРФ нефти на конфигурацию ПД в желудочковых миоцитах. 0,1% ВРФ нефти вызывает небольшое снижение амплитуды I_{Kr} , по всей видимости, недостаточное для значимого удлинения ПД. 1% ВРФ нефти вызывает почти двукратное снижение амплитуды I_{Kr} (рис. 2), что ведет к выраженному замедлению реполяризации и увеличению длительности ПД (рис. 1). Однако длительность ПД определяется не только амплитудой I_{Kr} , она зависит от соотношения реполяризующих и деполяризующих токов. Подавляющий эффект ВРФ нефти на кальциевый ток I_{Ca} также может сказываться на результирующей длительности ПД. По всей видимости, выраженное снижение I_{Ca} под действием 10% ВРФ нефти ограничивает вызванное блокированием каналов ERG увеличение длительности ПД при высоких концентрациях ПАУ.

В целом, показанное подавление токов I_{Kr} и I_{Ca} под действием ВРФ нефти и замедление реполяризации в желудочковых миоцитах согласуется с данными, полученными ранее в экспериментах с фенантроном [8] и флюореном [9] — трициклическими ПАУ, встречающимися в нефти в наиболее высоких концентрациях. Основное отличие эффектов ВРФ нефти (0,1–10%) от эффектов фенантрена и флюорена (1–10 мкМ) заключается в отсутствии выраженного ингибиторного воздействия на I_{Na} и, соответственно, угнетения деполяризации кардиомиоцитов, что выражается в отсутствии изменений в скорости нарастания переднего фронта ПД. Как ВРФ нефти, так и отдельные трициклические ПАУ [8, 9] совершенно не влияют на амплитуду и форму вольт-амперной характеристики тока I_{K1} , что согласуется с отсутствием изменений потенциала покоя (рис. 1Б). Относительное увеличение длительности ПД под действием 1–10% ВРФ нефти сравнимо по вели-

чине с аналогичным эффектом 3 мкМ флюорена или фенантрена. Для I_{Kr} IC_{50} составила 3,2% в экспериментах с ВРФ нефти и 0,54 мкМ при использовании чистого флюорена [9].

Чтобы прояснить возможную природу таких различий в эффектах отдельных ПАУ и ВРФ нефти, в рамках данного исследования мы также провели оценку концентраций трициклических ПАУ в 10%-ном растворе ВРФ нефти методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии. Было показано наличие 16 трициклических соединений (из них — 2 незамещенных) с совокупной концентрацией 3,2 мкг/л (в экспериментах [13] — от 2,8 мкг/л для всех ПАУ). Молярная концентрация незамещенных трициклических ПАУ составила лишь 4 нМ, однако их совокупная масса составила лишь 22,3% от общей массы трициклических ПАУ. Учитывая, что количество би- и тетрациклических ПАУ в 10%-ной ВРФ нефти не определяли, можно предположить, что общая концентрация всех растворенных ПАУ, способных воздействовать на ионные каналы, измеряется десятками нМ. Можно заключить, что концентрации ПАУ в 10%-ной ВРФ на несколько порядков ниже, чем необходимые для выраженного воздействия на I_{Na} и скорость деполяризации. В то же время действие ВРФ нефти как на I_{Kr} , так и на конфигурацию ПД оказалось явно сильнее, чем можно было бы предположить, опираясь на данные, полученные в экспериментах с фенантроном и флюореном. Таким образом, вся совокупность растворимых ПАУ, компонентов нефти, способна вызывать более существенные изменения электрической активности, чем отдельные исследованные в настоящее время соединения.

Заключение

В данной работе впервые удалось показать, что ВРФ нефти, содержащая разнообразные ПАУ, в 10 и 100-кратном разведении оказывает ингибирующее воздействие на основной реполяризующий ток миокарда рыб I_{Kr} , вызывая замедление реполяризации и увеличение длительности ПД в желудочковых миоцитах наваги, а также на ток I_{CaL} , что в тканевых препаратах предсердного миокарда приводит к кратковременному подавлению сократительной активности. При этом, в отличие от трициклических ПАУ, ВРФ нефти не оказывает существенного воздействия на фазу быстрой деполяризации ПД и быстрый натриевый ток I_{Na} . Таким образом, эффекты ВРФ нефти, представляющей собой сложную смесь ПАУ различной структуры, не представляют собой простую сумму исследованных на данный момент эффектов, входящих в состав нефти ПАУ. Принимая во внимание относительно низкую концентрацию ПАУ в ВРФ нефти и, в то же время, ее выраженное влияние на ток I_{Kr} , можно

предположить, что в составе нефти присутствуют еще не исследованные соединения, обладающие значительно более выраженными кардиотоксическими свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00075). В работе было использовано оборудование, приобретенное МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках федерального проекта «Развитие инфра-

структуры для научных исследований и подготовки кадров» национального проекта «Наука и университеты» от 29.12.2022г №15-пр/42 (соглашение №355 от 15.03.2024). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены локальным этическим комитетом МГУ имени М.В. Ломоносова (заявка №164-ж, заседание комиссии по биоэтике №156-д-з, дата заседания – 16.11.2023 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krupenio N.N., Parmuzin P.I., Zamoiskii V.L. Mapping of segments polluted by petroleum products in the Usinsk region of the Komi republic from remote-measurement data. *Hydrotechnical Construction*. 1995;29(11):648–652.
2. Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В. Физиологические эффекты полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в организме рыб. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биол.* 2023;78(3):127–138.
3. Marris C.R., Kompella S.N., Miller M.R., Incardona J.P., Brette F., Hancox J.C., Sorhus E., Shiels H.A. Polyaromatic hydrocarbons in pollution: a heart-breaking matter. *J. Physiol.* 2020;598(2):227–247.
4. Brette F., Machado B., Cros C., Incardona J.P., Scholz N.L., Block B.A. Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Biophys. J.* 2014;106(2):732a.
5. Vehniäinen E.R., Haverinen J., Vornanen M. Polycyclic aromatic hydrocarbons phenanthrene and retene modify the action potential via multiple ion currents in rainbow trout *oncorhynchus mykiss* cardiac myocytes. *Env. Toxicol. Chem.* 2019;38(10):2145–2153.
6. Ainerua M.O., Tinwell J., Kompella S.N., Sorhus E., White K.N., van Dongen B.E., Shiels H.A. Understanding the cardiac toxicity of the anthropogenic pollutant phenanthrene on the freshwater indicator species, the brown trout (*Salmo trutta*): From whole heart to cardiomyocytes. *Chemosphere*. 2020;239:124608.
7. Abramochkin D.V., Kompella S.N., Shiels H.A. Phenanthrene alters the electrical activity of atrial and ventricular myocytes of a polar fish, the Navaga cod. *Aquat. Toxicol.* 2021;235:105823.
8. Abramochkin D.V., Haverinen J., Mitenkov Y.A., Vornanen M. Temperature and external K^+ dependence of electrical excitation in ventricular myocytes of cod-like fishes. *J. Exp. Biol.* 2019;222(5):193607.
9. Kompella S.N., Brette F., Hancox J.C., Shiels H.A. Phenanthrene impacts zebrafish cardiomyocyte excitability by inhibiting IKr and shortening action potential duration. *J. Gen. Physiol.* 2021;153(2):e202012733.
10. Abramochkin D.V., Filatova T.S., Kuzmin V.S., Voronkov Y.I., Kamkin A., Shiels H.A. Tricyclic hydrocarbon fluorene attenuates ventricular ionic currents and pressure development in the navaga cod. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2023;273:109736.
11. Abramochkin D.V., Vornanen M. Inhibition of the cardiac ATP-dependent potassium current by KB-R7943. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2014;175:38–45.
12. Filatova T.S., Abramochkin D.V., Shiels H.A. Thermal acclimation and seasonal acclimatization: a comparative study of cardiac response to prolonged temperature change in shorthorn sculpin. *J. Exp. Biol.* 2019;222(Pt. 16):jeb202242.
13. Abramochkin D.V., Borodinova A.A., Rosenshtaukh L.V. Effects of acetylcholinesterase inhibitor paraoxon denote the possibility of non-quantal acetylcholine release in myocardium of different vertebrates. *J. Comp. Physiol. B.* 2012;182(1):101–108.
14. Heuer R.M., Galli G.L.J., Shiels H.A., Fieber L.A., Cox G.K., Mager E.M., Stieglitz J.D., Benetti D.D., Grosell M., Crossley Ii. D.A. Impacts of Deepwater Horizon crude oil on Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) heart cell function. *Environ. Sci. Technol.* 2019;53(16):9895–9904.
15. Haverinen J., Abramochkin D.V., Kamkin A., Vornanen M. Maximum heart rate in brown trout (*Salmo trutta fario*) is not limited by firing rate of pacemaker cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2017;312(2):R165–R171.
16. Abramochkin D.V., Filatova T.S., Pustovit K.B., Voronina Y.A., Kuzmin V.S., Vornanen M. Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2022;268:111204.
17. Filatova T.S., Abramochkin D.V., Pavlova N.S., Pustovit K.B., Kononova O.P., Kuzmin V.S., Dobrzynski H. Repolarizing potassium currents in working myocardium of Japanese quail: a novel translational model for cardiac electrophysiology. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2021;255:110919.
18. Abramochkin D.V., Vornanen M. Seasonal changes of cholinergic response in the atrium of Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*). *J. Comp. Physiol. B* 2017;187(2):329–338.
19. Belles B., Malécot C.O., Hescheler J., Trautwein W. “Run-down” of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflugers. Arch.* 1988;411(4):353–360.

Поступила в редакцию 08.04.2024

После доработки 21.05.2024

Принята в печать 10.06.2024

RESEARCH ARTICLE

The mechanisms of effects of oil-derived polyaromatic hydrocarbons on cardiac electrical activity in navaga cod (*Eleginus nawaga*)

T.S. Filatova^{1,2,*} , A.S. Borodkov³ , A.M. Karkhov^{1,2} , I.H. Dzhumaniiazova¹ ,
O.B. Pustovit¹ , D.V. Abramochkin¹ 

¹Department of Human and Animal Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Academician Smirnov Institute of Experimental Cardiology, Academician Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, st. Academician Chazova, 15a, Moscow, 121552, Russia;

³Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Kosygina st. 19–1, Moscow, 119991, Russia

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

The intensive development of oil and gas industries in the Arctic threatens Arctic aquatic ecosystems. The toxic and primarily lethal cardiotoxic effects of oil in living organisms are believed to be associated with polyaromatic hydrocarbons (PAHs), and previous works revealed the electrophysiological mechanisms of action of individual oil-derived PAHs. However, the physiological effects of a complex PAHs mixture in oil water-soluble fraction (WSF) have not been previously studied. This study is focused on the effects of oil WSF on electrical activity and major ionic currents in the working myocardium of navaga (*Eleginus nawaga*), which is one of the most important commercial fish species in the Arctic. We found that 1% and 10% solutions of oil WSF cause a marked increase in the duration of action potentials (APs) in navaga cardiomyocytes. This effect appears to be due to the suppression of rapid delayed rectifying current I_{Kr} (IC_{50} about 3% in ventricular and atrial myocardium). At higher concentrations, oil WSF also suppressed calcium current I_{CaL} ($IC_{50} = 10.6\%$), which led to a decrease in the contractile activity in isolated myocardial preparations. Unlike individual tricyclic PAHs, oil WSF did not affect fast sodium current I_{Na} and AP upstroke velocity. An assessment of the content of tricyclic PAHs in 10% solution of oil WSF showed that their total concentration is relatively low and does not exceed 100 nM. Thus, oil WSF also has a powerful cardiotoxic effect in fish myocardium, but its effects differ from the previously studied effects of tricyclic PAHs and suggest the presence of yet unexplored oil compounds that have a more powerful toxic potential against ERG channels.

Keywords: cardiomyocyte, action potential, patch-clamp, polyaromatic hydrocarbons, ionic currents, oil

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project № 22-14-00075.

Сведения об авторах

Филатова Татьяна Сергеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0131-1911>

Бородков Алексей Сергеевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории инструментальных методов и органических реагентов ГЕОХИ РАН. Тел.: 8-495-939-70-91; e-mail: abors@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7372-9324>

Кархов Андрей Михайлович — студент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: akarchoff@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0919-0712>

Джуманиязова Ирина Хамрабековна — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: dzhumaniiazova.irina.2019@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5167-2112>

Пустовит Оксана Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5137-2187>

Абрамочкин Денис Валерьевич — докт. биол. наук, зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: abram340@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5751-8853>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.822.3

Регуляция активности регенерирующих моторных синапсов с участием эндоканнабиноидов

П.О. Богачева , К.А. Чернышев , Е.О. Тарасова ,
Д.А. Потапова , О.П. Балежина*

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

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

В работе исследовали влияние эндоканнабиноидов арахидоноилэтаноламида (АЭА), известного также как анандамид, и 2-арахидоноилглицерина (2-АГ) на параметры миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных потенциалов концевой пластинки (ПКП) моторных синапсов, восстанавливающихся в ходе реиннервации мышцы — длинного разгибателя пальцев мыши. 2-АГ увеличивал амплитуду МПКП на 35%, а также увеличивал амплитуду ПКП на 37%, не влияя при этом на квантовый состав ПКП и другие параметры секреции медиатора. Эффект предотвращался ингибитором везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом и обратным агонистом каннабиноидных рецепторов СВ1-типа AM251. АЭА не вызывал изменений амплитуды и других параметров МПКП, однако снижал квантовый состав ПКП на 27%. Тормозный эффект АЭА предотвращался AM251, а также блокатором Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипином. Впервые установлено, что в регенерирующих моторных синапсах АЭА и 2-АГ, активируя один и тот же тип пресинаптических СВ-рецепторов, имеют разные конечные мишени, влияют на разные параметры квантовой секреции ацетилхолина и оказывают разнонаправленное воздействие на синаптическую передачу. Наличие как облегчающих, так и тормозных эффектов эндоканнабиноидов может служить для тонкой настройки и регуляции синаптической передачи в созревающих моторных контактах.

Ключевые слова: регенерация, моторные синапсы, эндоканнабиноиды, анандамид, 2-арахидоноилглицерин, потенциалы концевой пластинки

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-12

Введение

Эндоканнабиноиды (ЭК) — липофильные молекулы, высвобождаемые из фосфолипидов клеточных мембран. Наиболее широко представлены два классических ЭК — арахидоноилэтаноламид (АЭА), известный также как анандамид, и 2-арахидоноилглицерин (2-АГ), близкие по структуре, но синтезируемые и расщепляемые с помощью разных ферментных систем. Подробно описана их продукция и свойства в центральных синапсах: образуясь в постсинаптических структурах во время синаптической активности, ЭК ретроградно воздействуют на пресинаптические каннабиноидные рецепторы СВ1- или СВ2-типа [1]. Это приводит к торможению секреции медиаторов и подавлению передачи в синапсах ЦНС [2].

Спектр активности ЭК, однако, не исчерпывается их центральным действием. Описана возможность синтеза и высвобождения ЭК в целом ряде

периферических органов и тканей, в том числе и в скелетной мускулатуре [3]. Показано присутствие СВ-рецепторов как на мышечных волокнах, так и в нервных терминалях моторных синапсов [3, 4]. Немногочисленные исследования влияния ЭК на моторные синапсы скелетных мышц, однако, дали противоречивые результаты [5–7].

В последние годы нами были обнаружены неканонические, не имеющие аналогов в синапсах ЦНС, эффекты ЭК, облегчающие передачу в зрелых моторных синапсах. 2-АГ, действуя на пресинаптические СВ1-рецепторы, увеличивал размер кванта медиатора и амплитуду МПКП [5, 8–10]. АЭА, также активируя СВ1-рецепторы, увеличивал квантовый состав ПКП [8, 9]. Могут ли АЭА и 2-АГ оказывать аналогичные либо другие влияния и на функционально незрелые, регенерирующие моторные синапсы, — оставалось не изученным. Целью данной работы стало исследование

реактивности регенерирующих синапсов к воздействиям экзогенных АЭА и 2-АГ, а также определение возможных рецепторов и механизмов, участвующих в эффектах ЭК в регенерирующих синапсах, используя модель денервации-реиннервации мышцы — длинного разгибателя пальцев (*m. extensor digitorum longus (m. EDL)*) мышцы.

Материалы и методы

Объект исследования. Эксперименты проводили на нервно-мышечных препаратах длинного разгибателя пальцев и малоберцового нерва (*m. EDL — n. peroneus*), взрослых (P45–60) самцов мышей линии BALB/c, полученных из лаборатории экспериментальных животных биологического факультета МГУ, Москва, Россия. Содержание животных и экспериментальные процедуры соответствовали директиве 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными. Мыши умерщвлялись посредством ингаляции изофлюраном и последующего быстрого обезглавливания.

Для запуска новообразования синапсов за 11 сут до эксперимента проводили хирургическую операцию по передавливанию *n. peroneus*. Под изофлюрановой анестезией животным разрезали кожу и мышцы бедра и раздавливали участок нерва в 10 мм от его входа в *m. EDL* глазным пинцетом (толщина браншей 1 мм) с силиконовыми насадками. Успешность повреждения оценивали по появлению на нерве прозрачного участка в месте сдавливания. Подобная модель денервации-реиннервации широко используется в нейрофизиологии [11–16].

Электрофизиологические эксперименты. Изолированный нервно-мышечный препарат помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл, перфузируемую оксигенированным (95% O₂, 5% CO₂) раствором Лайли (135 мМ — NaCl, 1 мМ — MgCl₂, 4 мМ — KCl, 0,9 мМ — NaH₂PO₄, 2 мМ — CaCl₂, 11 мМ — C₆H₁₂O₆, 16 мМ — NaHCO₃).

Внутриклеточную регистрацию спонтанных одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных стимуляцией нерва (50 Гц, 1 с) потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов (сопротивление кончика 15–20 МОм) и усилителя биопотенциалов Axoclamp–2B (Molecular Devices, США). Сигналы оцифровывали при помощи АЦП E–154 (L-Card, Россия) с программным интерфейсом PowerGraph (ДиСофт, Россия). Обработку сигналов проводили при помощи программы MiniAnalysis (Synaptosoft, США).

Для регистрации ПКП, нерв раздражали серебряными биполярными электродами. Для предотвращения мышечных сокращений в ответ на стимуляцию предварительно проводили рассечение мышечных волокон *m. EDL* (методика описана ранее [17]). Такой подход позволяет одновременно

регистрировать МПКП и ПКП в одном и том же синапсе и в дальнейшем рассчитывать квантовый состав ПКП.

Регистрировали спонтанную и/или вызванную активность как минимум 5 синапсов в контроле, затем в омывающий раствор добавляли исследуемые вещества и регистрировали активность 5–10 синапсов на протяжении 60 мин инкубации с веществами.

В каждой серии экспериментов использовали не менее 3 нервно-мышечных препаратов.

Анализ данных и статистика. Оценивали мембранный потенциал (МП) мышечных волокон, время нарастания и время полуспада МПКП, их амплитуду и частоту; амплитуду и квантовый состав ПКП. Для нивелирования изменения движущей силы сдвига потенциала при изменениях МП стандартизировали значение амплитуд МПКП в нерассеченных нервно-мышечных препаратах к МП –70 мВ; в рассеченных препаратах амплитуды МПКП и ПКП стандартизировали к –50 мВ. Квантовый состав (КС) ПКП оценивали, как отношение амплитуды ПКП к средней амплитуде МПКП в данном синапсе.

Статистический анализ проводили в GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, США). Нормальность распределения значений оценивали по критерию Д’Агостино–Пирсона. Достоверность различий между выборками оценивали при помощи критериев Стьюдента, Манна–Уитни и двухфакторного дисперсионного анализа. Уровень статистической значимости отличий между выборками составлял 0,05 (*n* — количество исследованных синапсов). Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Материалы. В экспериментах использовали: АЭА (Merck, США); 2-АГ, AM251 и нитрендипин (Tocris, США); везамикол (Enzo Life Sciences, США). Для приготовления стоковых растворов всех веществ в качестве растворителя использовали DMSO (Хеликон, Россия). Финальная концентрация DMSO в рабочем растворе составляла не более 0,01% (v/v) и не оказывала самостоятельного действия на параметры синаптической активности.

Результаты и обсуждение

Синапсы, находящиеся на ранней стадии формирования в ходе реиннервации мышечных волокон, имеют не только структурные, но и функциональные отличия от зрелых. Поэтому, прежде чем перейти к изложению результатов, стоит охарактеризовать базовые параметры синаптической передачи в регенерирующих синапсах *m. EDL* и их отличия от таковых в зрелых синапсах этой мышцы.

Спонтанная одноквантовая секреция характеризуется очень низкой частотой, но при этом достаточно высокой амплитудой за счет встречающихся «гигантских» МПКП, а также более

продолжительными временами нарастания и спада. Амплитуда и квантовый состав ПКП значительно ниже, чем в зрелых синапсах. Это связано с меньшим размером самих нервных терминалей и количеством активных зон в них, и, как следствие, со сниженным размером готового к выбросу пула везикул [13]. Кроме этого, при высокочастотном раздражении нерва в регенерирующих моторных синапсах наблюдается особый паттерн синаптической пластичности: в отличие от зрелых синапсов, депрессия передачи по ходу залпа ПКП не развивается, а напротив, амплитуда ПКП возрастает по сравнению с первым ПКП.

Таким образом, мембранный потенциал покоя в нерасщепленных волокнах реиннервированной *m. EDL* составлял $-65,1 \pm 0,5$ мВ. В препаратах интактной *m. EDL* это значение равнялось $-68 \pm 0,7$ мВ.

Средние значения параметров МПКП в регенерирующих синапсах в контроле таковы: амплитуда $1,0 \pm 0,05$ мВ, частота $0,2 \pm 0,04$ Гц, время нарастания 10–90% $1,4 \pm 0,06$ мс, время полуспада $4,5 \pm 0,18$ мс. В зрелых же синапсах эти параметры следующие: амплитуда МПКП $0,8 \pm 0,04$ мВ, частота $0,6 \pm 0,04$ Гц, время нарастания 10–90% $0,9 \pm 0,03$ мс, время полуспада $2,7 \pm 0,11$ мс.

Параметры ПКП в регенерирующих синапсах в контроле, в среднем, таковы: амплитуда $11,0 \pm 0,8$ мВ, квантовый состав 15 ± 1 . В функционально зрелых синапсах амплитуда ПКП, в среднем, достигает $17,0 \pm 0,6$ мВ, а квантовый состав $26,0 \pm 1$.

Влияние 2-АГ на секрецию медиатора в регенерирующих моторных синапсах. При аппликации 2-АГ (1 мкМ) не наблюдали изменений МП мышечных волокон, частоты или временных параметров МПКП. При этом значительно, на 35%, возросла средняя амплитуда МПКП (рис. 1А). Это сопровождалось сдвигом кумулятивной кривой вероятности распределения амплитуд вправо, в область более высоких значений (рис. 1Б).

Таким образом, 2-АГ в регенерирующих синапсах приводил к возрастанию амплитуды МПКП, не затрагивая другие параметры, что полностью повторяет его эффект, ранее обнаруженный нами в зрелых моторных синапсах [9].

Необходимо было выяснить, связано ли такое увеличение амплитуды МПКП с увеличением размера кванта ацетилхолина (АХ). Везамикол (ингибитор везикулярного транспорта АХ, в концентрации 1 мкМ) полностью предотвращал потенцирующий эффект 2-АГ (рис. 1В, Г). Из этого следует, что наблюдаемый эффект развивался на пресинаптическом уровне и был ассоциирован с увеличением размера отдельных квантов АХ. Эти данные снова оказались аналогичны полученным ранее на зрелых моторных синапсах [8]. Это означает, что уже на стадии новообразования нервно-мышечных контактов функционально незрелые синапсы обладают реактивностью к 2-АГ, схожей с таковой у зрелых синапсов.

Влияние 2-АГ на вызванную многоквантовую секрецию АХ выражалось в равномерном приросте амплитуды ПКП в залпах на 33%. Значения

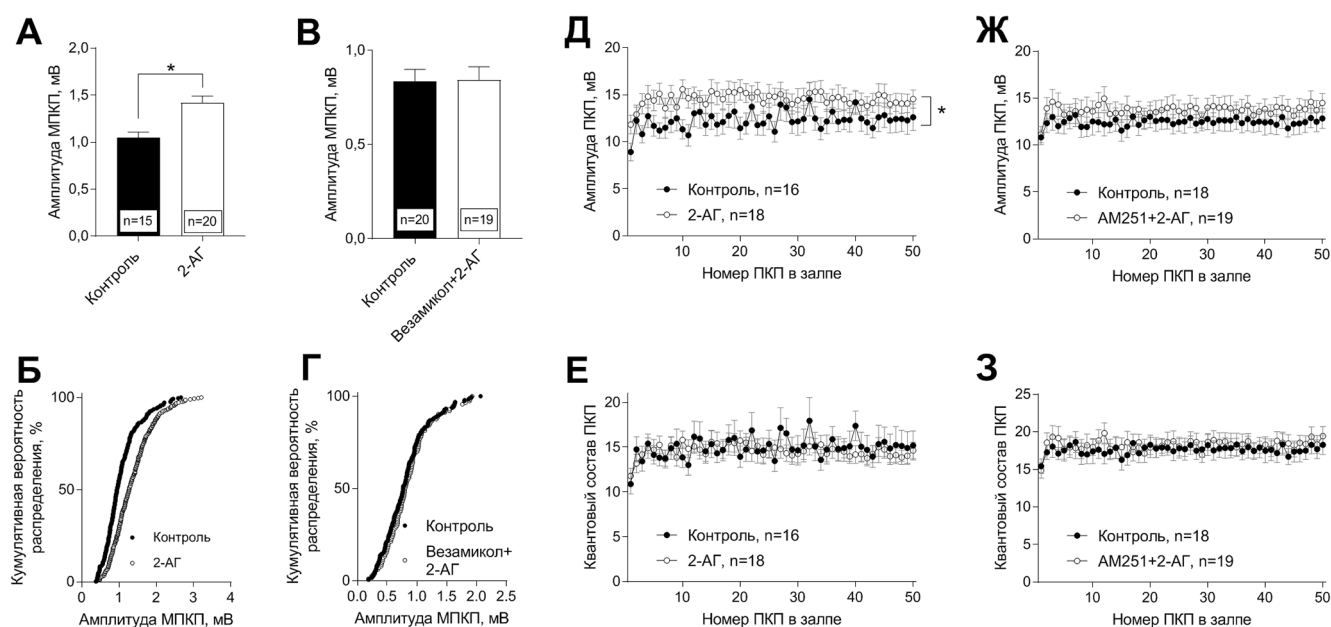


Рис. 1. Влияние 2-арахидоноилглицерина (2-АГ) на спонтанную и вызванную секрецию ацетилхолина (АХ) в регенерирующих моторных синапсах. **А** — возрастание амплитуды миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) под действием 2-АГ, **Б** — сдвиг кумулятивной кривой вероятности распределения МПКП под действием 2-АГ, **В** — отсутствие влияния 2-АГ на амплитуду МПКП в присутствии везамикола, **Г** — отсутствие сдвига кумулятивной кривой вероятности распределения МПКП в присутствии везамикола и 2-АГ, **Д** — увеличение амплитуды потенциалов концевой пластинки (ПКП) в залпе под действием 2-АГ, **Е** — отсутствие изменений квантового состава (КС) ПКП под действием 2-АГ, **Ж**, **З** — отсутствие изменений амплитуды и КС ПКП в присутствии AM251 и 2-АГ; * — значимые различия при $p < 0,05$.

КС ПКП остались при этом на прежнем уровне, поскольку амплитуда МПКП, зарегистрированных параллельно с ПКП, также значимо выросла (рис. 1Д, Е).

На основании этих результатов можно предполагать, что увеличение амплитуды ПКП было связано с увеличением размера каждого кванта АХ в составе многоквантовых ПКП. Количество же квантов, секретируемых в ответ на каждый стимул, не изменялось.

Обнаружив выраженное потенцирующее влияние 2-АГ на синаптическую передачу в регенерирующих синапсах, было необходимо установить, каким типом СВ-рецепторов оно опосредовано.

Мы использовали обратный агонист каннабиноидных рецепторов СВ1-типа AM251 (1 мкМ). Сам по себе он не оказывал влияния на спонтанную и вызванную секрецию АХ. Однако в присутствии AM251 2-АГ более не приводил к возрастанию амплитуды ПКП (рис. 1Ж, 3). Это свидетельствует о том, что в регенерирующих синапсах 2-АГ реализует свои потенцирующие влияния на размер кванта медиатора, путем активации СВ1-рецепторов и последующего запуска механизма, приводящего к усилению загрузки АХ в везикулы и, как следствие, к росту размера квантов АХ. Подобная цепочка событий, включающая также участие протеинкиназы А, была описана нами ранее в зрелых моторных синапсах [8, 9]. Возможность запуска такого необычного для ЭК, неканонического регуляторного каскада в терминалах зрелых моторных синапсов была показана и в работе Морша и соавт.: при действии синтетического агониста СВ1-рецепторов,

также наблюдался рост амплитуды МПКП и ПКП, предотвращавшийся везамиколом [7].

В данной работе же нам впервые удалось обнаружить неканоническое, облегчающее синаптическую передачу, влияние экзогенного 2-АГ и в моторных синапсах с ослабленным функциональным статусом, находящихся на ранней стадии регенерации.

Влияние АЭА на секрецию медиатора в регенерирующих моторных синапсах. При аппликации АЭА (10 мкМ) не наблюдалось достоверных изменений МП мышечных волокон и параметров МПКП — их амплитуды, частоты или временного хода. На кумулятивной кривой вероятности распределения амплитуд МПКП не наблюдали сдвига относительно контроля (рис. 2А, Б). Таким образом, в отличие от 2-АГ, АЭА не влиял на спонтанную активность регенерирующих моторных терминалей. Однако ранее мы продемонстрировали, что в зрелых моторных синапсах АЭА облегчает спонтанную секрецию АХ, увеличивая частоту МПКП [9], а Морш и соавт. обнаружили увеличение амплитуды МПКП в присутствии АЭА [7].

Неожиданными и не совпадающими с эффектами в зрелых синапсах оказались и изменения ПКП. АЭА приводил к равномерному снижению амплитуды ПКП по ходу залпов на 27%. Поскольку амплитуда МПКП значимо не изменялась, то вместе с амплитудой ПКП параллельно снижался и их КС, в среднем, на 22% (рис. 2В, Г). Эти данные показывают, что действие АЭА в регенерирующих синапсах направлено на регуляцию количества секретируемых квантов медиатора, а не на размер отдельных квантов.

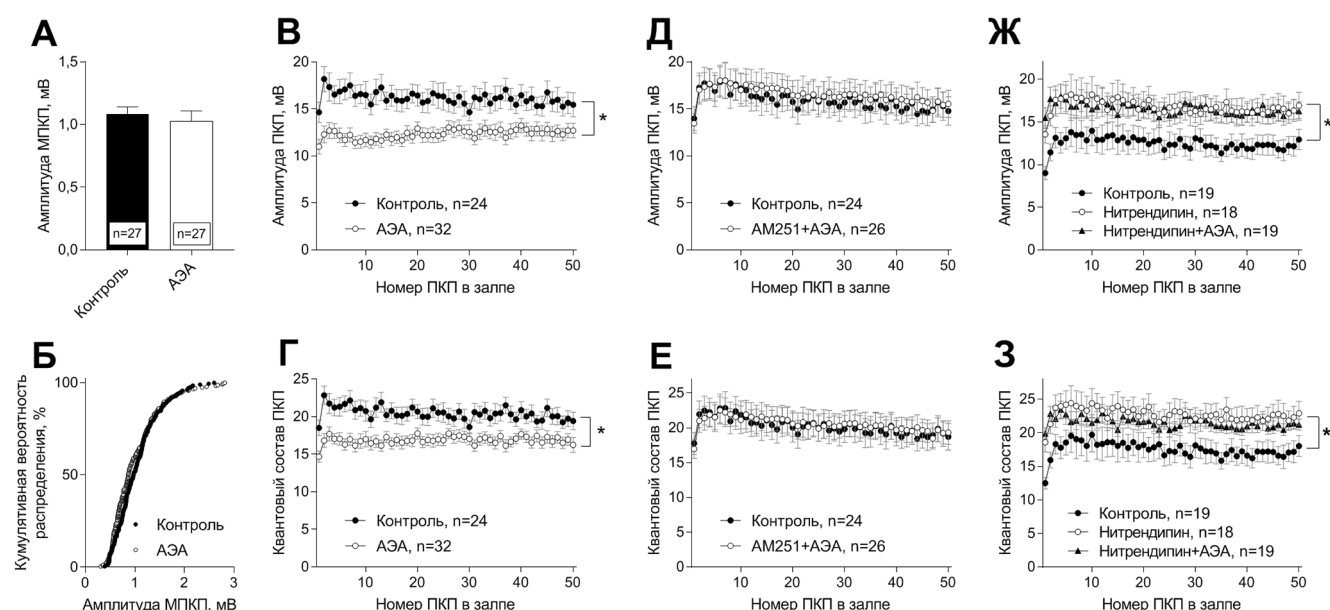


Рис. 2. Влияние арахидоноилэтаноламида (АЭА) на спонтанную и вызванную секрецию АХ в регенерирующих моторных синапсах. А — отсутствие изменений амплитуды МПКП под действием АЭА, Б — отсутствие сдвига кумулятивной кривой вероятности распределения МПКП под действием АЭА, В — снижение амплитуды ПКП в залпе под действием АЭА, Г — снижение КС ПКП в залпе под действием АЭА, Д — отсутствие изменений амплитуды ПКП в залпе в присутствии AM251 и АЭА, Е — отсутствие изменений КС ПКП в залпе в присутствии AM251 и АЭА, Ж — утрата влияния АЭА на амплитуду ПКП в залпе на фоне действия нитрендипина, З — утрата влияния АЭА на КС ПКП в залпе на фоне действия нитрендипина. * — значимые различия при $p < 0,05$.

Удивительным оказался и тот факт, что тормозный эффект АЭА полностью предотвращался в присутствии AM251 (1 мкМ) (рис. 2Д, Е), а значит, и этот ЭК оказывал свое действие в регенерирующих синапсах путем активации рецепторов СВ1-типа.

Далее было необходимо установить, каким же образом АЭА приводит к снижению КС ПКП в регенерирующих синапсах.

Ранее в наших исследованиях эффектов АЭА в зрелых синапсах было установлено, что в качестве мишени действия АЭА могут выступать потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы L-типа [9]. Мы предположили, что и в функционально незрелых синапсах действие АЭА может быть нацелено на активацию этого типа каналов. Дополнительным основанием для такого предположения был и тот факт, что снижение уровня вызванной секреции медиатора, напоминающее эффекты АЭА, наблюдалось при активации Ca^{2+} -каналов L-типа в регенерирующих синапсах. Блокада же этих каналов приводила к выраженному облегчению вызванной секреции [14, 18, 19]. Поэтому мы далее исследовали, сохранится ли тормозный эффект АЭА в условиях блокады Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипином.

Под действием нитрендипина (1 мкМ), как и ожидалось, наблюдали статистически значимый прирост амплитуды и КС ПКП на 50% по всему ходу залпа. Однако в этих условиях добавление АЭА (10 мкМ) не привело к дальнейшим изменениям амплитуды и КС ПКП (рис. 2Ж, 3).

Итак, несмотря на наличие собственного, облегчающего передачу, эффекта нитрендипина, последующее добавление АЭА могло бы нивелировать этот прирост амплитуды и КС ПКП, если бы он действовал через независимые от Ca^{2+} -каналов L-типа сигнальные каскады. Но тормозный эффект АЭА не проявился на фоне действия нитрендипина. Это позволяет предполагать, что мишенью действия АЭА в регенерирующих синапсах действительно являются Ca^{2+} -каналы L-типа.

Из литературных данных известно, что в центральных синапсах пресинаптические Ca^{2+} -каналы L-типа оказывают стимулирующее действие на секрецию медиатора [20, 21]. Эти каналы ингибируются при действии агонистов СВ1-рецепторов, а АЭА способен оказывать на них ингибирующее действие и независимо от активации СВ-рецепторов [22]. Однако способность АЭА не тормозить, а усиливать активность Ca^{2+} -каналов L-типа с помощью СВ1-опосредованного действия до сих пор не была показана. Такой неканонический механизм действия АЭА является, видимо, специфическим для периферических синапсов и представляет интерес для дальнейшего изучения.

Таким образом, мы установили, что и 2-АГ, и АЭА в регенерирующих синапсах: активируют пресинаптические СВ1-рецепторы, но при этом

вызывают противоположно направленные изменения квантовой секреции АХ, благодаря действию на разные параметры синаптической передачи (размер кванта в случае 2-АГ и КС ПКП в случае АЭА). Такой дуализм может быть следствием известного явления смещенного агонизма, характерного для ЭК, когда действие разных каннабиноидных лигандов (2-АГ, АЭА или других) на один и тот же тип метаботропных СВ-рецепторов может приводить к активации разных внутриклеточных каскадов и мишеней в нервных терминалях [5]. Для СВ1-рецепторов показана возможность взаимодействия как с $G_{i/o}$ белками, так и с G_s и G_q [23, 24]. При этом разные агонисты могут поощрять определенные конформации СВ1-рецептора и, соответственно, его взаимодействие с разными типами G-белков, запуская в дальнейшем разные сигнальные пути [25].

Заключение

В данной работе впервые удалось обнаружить ранее не известное, облегчающее синаптическую передачу, влияние экзогенного 2-АГ в регенерирующих синапсах, выражающееся в виде повышения амплитуды МПКП и ПКП. Это действие 2-АГ оказалось аналогичным таковому в зрелых синапсах и связанным с активацией пресинаптических СВ1-рецепторов и последующим увеличением размера квантов АХ. Роль такого потенцирования синаптической передачи под действием 2-АГ в регенерирующих синапсах может заключаться в повышении надежности синаптической передачи и поддержании эффективности моторного контроля.

У другого ЭК (АЭА) в регенерирующих синапсах впервые было обнаружено противоположно направленное СВ1-зависимое тормозное действие, подавляющее секрецию АХ за счет снижения КС ПКП. Причиной такого торможения оказалась дополнительная активация пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа, которые, как известно, обладают необычным подавляющим действием на вызванную секрецию АХ в синапсах, находящихся на ранних стадиях формирования.

Предполагаемая роль АЭА в регенерирующих синапсах может заключаться в снижении вероятности истощения пула везикул при многоквантовой секреции, вызванной высокочастотной стимуляцией нерва.

Таким образом, исследование эффектов ЭК в функционально незрелых моторных синапсах впервые показало, что, несмотря на ослабленное функциональное состояние, такие контакты обладают высокой реактивностью к двум основным ЭК — АЭА и 2-АГ. Это раскрывает важную роль ЭК системы в регуляции синаптической передачи не только в центральных, но и в периферических синапсах, в том числе и на разных стадиях их функциональной зрелости. Наличие у ЭК систе-

мы как облегчающих, так и тормозных эффектов в регенерирующих моторных синапсах, а также неканонические механизмы их реализации, могут служить для тонкой регуляции процессов созревания, стабилизации или элиминации синапсов в ходе онтогенеза или при посттравматической реиннервации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hillard C.J. Circulating endocannabinoids: From whence do they come and where are they going? *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(1):155–172.
- Ohno-Shosaku T., Tanimura A., Hashimoto-dani Y., Kano M. Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist*. 2012;18(2):119–132.
- Dalle S., Schouten M., Meeus G., Slagmolen L., Koppo K. Molecular networks underlying cannabinoid signaling in skeletal muscle plasticity. *J. Cell. Physiol.* 2022;237(9):3517–3540.
- Ge D., Odierna G.L., Phillips W.D. Influence of cannabinoids upon nerve-evoked skeletal muscle contraction. *Neurosci Lett*. 2020;725:134900.
- Balezina O.P., Tarasova E.O., Gaydukov A.E. Non-canonical Activity of endocannabinoids and their receptors in central and peripheral synapses. *Biochemistry (Mosc.), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2021;86(7):818–832.
- Haynes E.M., Kalmar J.M., Vis-Dunbar M., Crosby K.M., Mriduraj A., Jakobi J.M. A systematic review of how cannabinoids affect motoneuron output. *J. Neurophysiol.* 2023;130(2):247–263.
- Morsch M., Protti D.A., Cheng D., Braet F., Chung R.S., Reddel S.W., Phillips W.D. Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission. *Sci. Rep.* 2018;8(1):4685.
- Tarasova E.O., Khotkina N.A., Bogacheva P.O., Chernyshev K.A., Gaydukov A.E., Balezina O.P. Noncanonical potentiation of evoked quantal release of acetylcholine by cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in mouse motor synapses. *Biochemistry (Mosc.), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2021;15(4):395–405.
- Tarasova E.O., Khotkina N.A., Gaydukov A.E., Balezina O.P. Spontaneous acetylcholine release potentiation induced by 2-arachidonoylglycerol and anandamide in mouse motor synapses. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021;76(1):1–6.
- Tarasova E., Bogacheva P., Chernyshev K., Balezina O. Quantal size increase induced by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol requires activation of CGRP receptors in mouse motor synapses. *Synapse*. 2024;78(1):e22281.
- McArdle J.J., Albuquerque E.X. A Study of the reinnervation of fast and slow mammalian muscles. *J. Gen. Physiol.* 1973;61(1):1–23.
- McArdle J.J. Complex end-plate potentials at the regenerating neuromuscular junction of the rat. *Experimental. Neurology*. 1975;49(3):629–638.
- Argentieri T.M., Aiken S.P., Laxminarayan S., McArdle J.J. Characteristics of synaptic transmission in reinnervating rat skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 1992;421(2–3):256–261.
- Балезина О. П., Богачева П. О., Орлова Т. Ю. Влияние блокаторов кальциевых каналов L-типа на активность новообразуемых синапсов мыши. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2007;143(2):128–131.
- Favero M., Lorenzetto E., Bidoia C., Buffelli M., Busetto G., Cangiano A. Synapse formation and elimination: role of activity studied in different models of adult muscle reinnervation. *J. Neurosci. Res.* 2007;85(12):2610–2619.
- Teodori R.M., Betini J., de Oliveira L.S., Sobral L.L., Takeda S.Y., de Lima Montebelo M.I. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. *Neural. Plast.* 2011;2011:783901.
- Gaydukov A.E., Bogacheva P.O., Tarasova E.O., Molchanova A.I., Miteva A.S., Pravdivceva E.S., Balezina O.P. Regulation of acetylcholine quantal release by coupled thrombin/BDNF signaling in mouse motor synapses. *Cells*. 2019;8(7):762.
- Sugiura Y., Ko, C.P. Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 1997;17(3):1101–1111.
- Santafe M.M., Garcia N., Lanuza M.A., Uchitel O.D., Tomas J. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neurosci.* 2001;102(3):697–708.
- Rey S., Maton G., Satake S., Llano I., Kang S., Surmeier D.J., Silverman R.B., Collin T. Physiological involvement of presynaptic L-type voltage-dependent calcium channels in GABA release of cerebellar molecular layer interneurons. *J. Neurochem.* 2020;155(4):390–402.
- Deng W.K., Wang X., Zhou H.C., Luo F. L-type Ca^{2+} channels and charybdotoxin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channels are required for reduction of GABAergic activity induced by β_2 -adrenoceptor in the prefrontal cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* 2019;101:103410.
- Boczek T., Zylińska L. Receptor-dependent and independent regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} -permeable channels by endocannabinoids in the brain. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(15):8168.
- Zou S., Kumar U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(3):833.
- Laprairie R.B., Bagher A.M., Kelly M.E., Dupre D.J., Denovan-Wright E.M. Type 1 cannabinoid receptor ligands display functional selectivity in a cell culture model of striatal medium spiny projection neurons. *J. Biol. Chem.* 2014;289(36):24845–24862.
- Al-Zoubi R., Morales P., Reggio P. H. Structural insights into CB1 receptor biased signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(8):1837.

Поступила в редакцию: 12.03.2024

После доработки: 15.04.2024

Принята в печать: 25.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Regulation of neurotransmission in regenerating neuromuscular junctions involving endocannabinoids

P.O. Bogacheva , K.A. Chernyshev , E.A. Tarasova , D.A. Potapova , O.P. Balezina* 

Department of Human and animal physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

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

The work was dedicated to investigation of the influence of two endocannabinoids – arachidonylethanolamide (AEA), also known as anandamide, and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) on the parameters of miniature endplate potentials (MEPP) and evoked endplate potentials (EPP) of motor synapses at the early stage of regeneration during muscle reinnervation. 2-AG increased the amplitude of MEPP by 35%, and also increased the amplitude of EPP by 37%, without affecting quantal content of EPP or any other parameters of neurotransmitter secretion. This effect was prevented by vesicular acetylcholine transporter inhibitor vesamicol and by inverse agonist of CB1-type cannabinoid receptors AM251. AEA did not change the amplitude or any other parameters of MEPP, but reduced the quantal content of EPP by 27%. The inhibitory effect of AEA was prevented by AM251 and by the L-type Ca^{2+} channel blocker nitrendipine. Thus, it was established for the first time that in newly formed motor synapses AEA and 2-AG activate the same type of presynaptic cannabinoid receptors, but have different final targets, influence different parameters of quantal ACh secretion and have multidirectional effects on synaptic transmission. The presence of both facilitatory and inhibitory effects of endocannabinoids in regenerating synapses may serve to fine-tune and regulate synaptic transmission during their maturation.

Keywords: *regeneration, neuromuscular junctions, endocannabinoids, anandamide, 2-arachidonoylglycerol, endplate potentials*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-25-00065.

Сведения об авторах

Богачева Полина Олеговна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: untergang@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3525-4815>

Чернышев Кирилл Андреевич — студент магистратуры 2 года обучения кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: cherkir2000@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7692-5080>

Тарасова Екатерина Олеговна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: cate1990@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2233-1228>

Потапова Диана Андреевна — студент магистратуры 1 года обучения кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: potapovadiana2001@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-3866-647X>

Балезина Ольга Петровна — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: balezina@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6072-134X>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.821.6+612.821.2+612.825.5

Локализация источников десинхронизации мю-ритма ЭЭГ при тактильном воображении

Л.В. Яковлев^{1,2,*} , Н.В. Сыров² , А.А. Мирошников¹ , М.В. Морозова² ,
А.М. Беркмуш-Антипова³ , Д.А. Петрова² , А.Я. Каплан^{1,2}

¹Лаборатория нейрофизиологии и нейрокомпьютерных интерфейсов, кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205, г. Москва, Большой бульвар, д. 30, стр. 1;

³Балтийский центр нейротехнологий и искусственного интеллекта, Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Россия, 236041, г. Калининград, ул. А. Невского, д. 14

*e-mail: lejackovlev@gmail.com

Тактильное воображение до сих пор остается малоизученным феноменом в области исследований способности человека к формированию мысленных образов. В то же время наряду с воображением движений эта техника может стать эффективным инструментом сенсомоторной реабилитации после инсульта и травм спинного мозга. В настоящем исследовании, проведенном на 22 здоровых добровольцах, была изучена локализация источников десинхронизации (подавления) мю-ритма электроэнцефалограммы с использованием многоканальной регистрации и последующим решением обратной задачи методом sLORETA. У всех участников исследования наблюдалась десинхронизация мю-ритма при выполнении задачи на тактильное воображение, а также под воздействием вибротактильной стимуляции. Было показано, что десинхронизация при вибротактильной стимуляции, равно как и при тактильном воображении, локализована в сенсомоторных областях коры больших полушарий. В пространстве источников было показано, что десинхронизация в постцентральной извилине была значимо выше по сравнению с прецентральной извилиной. Полученные результаты указывают на то, что тактильное воображение, подобно восприятию реальных тактильных стимулов, приводит к устойчивой активации сенсомоторных отделов коры больших полушарий, что согласуется с общими представлениями об общей активации нейрональных структур головного мозга при воображении и восприятии.

Ключевые слова: сенсомоторный ритм, мю-ритм, десинхронизация, тактильное воображение, локализация источников, обратная задача

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-2S-13

Введение

Комплекс работ в области нейроинтерфейсных технологий, выполненный к настоящему времени на кафедре физиологии человека и животных в лаборатории нейрофизиологии и нейрокомпьютерных интерфейсов [1–7], а также данные других исследователей показали, во-первых, возможность создания высокоэффективных систем трансляции намерений человека к исполнительным устройствам на основе регистрации электроэнцефалограммы (ЭЭГ), во-вторых, перспективность использования этих технологий в области медицинской реабилитации. В частности, нейроинтерфейсные технологии оказались полезными для

оптимизации тренировочного процесса при восстановлении моторных функций после инсультов и нейротравм на основе идеомоторного тренинга, в рамках которого пациенты должны многократно мысленно представлять нужное движение, что в конечном счете позитивно откликается в необходимых пластических перестройках структур коры больших полушарий [8]. В контуре интерфейсов мозг-компьютер стало возможным в реальном времени информировать пациентов о качестве очередного акта мысленного представления движения, маркером которого в ЭЭГ является десинхронизация (подавление) мю-ритма [9, 10]. Тем не менее эффективность технологий нейроинтерфей-

сов на основе мысленного представления движений все еще не достигла оптимального уровня. В значительной мере это может быть связано с недостаточной в лабораторном исполнении мультисенсорностью ментального образа движения, который в естественных условиях обогащен разными сенсорными модальностями и в первую очередь — тактильными ощущениями [6, 7].

В общем случае способность к мысленному представлению сенсорных образов (далее — воображение) в отсутствие внешней физической стимуляции является ключевой когнитивной способностью человека. Воображение охватывает все сенсорные модальности — зрительную, слуховую, вкусовую, ольфакторную и соматосенсорную [11, 12]. Также известно моторное воображение (представление движений), которое заключается в мысленном воспроизведении сенсорных характеристик, ассоциированных с выполнением движений (зрительных, тактильных, кинестетических) [13, 14]. Воображение играет важную роль в таких когнитивных процессах и способностях человека как память, креативность, способность к решению задач и принятию решений [15–18]. В то время, как большинство исследований воображения сфокусированы на зрительном [19–21] и моторном [4–6; 22–27] типах воображения, соматосенсорное воображение вне контекста движения, изучено мало [7, 11, 28–31].

Согласно общепринятой модели, процесс воображения может быть представлен, как «обращенный во времени» процесс сенсорного восприятия, реализуемый за счет последовательной активации мозговых структур, начинаясь в таких структурах как фронтальная кора, гиппокамп, теменная кора, и оканчиваясь в первичных сенсорных областях, соответствующих конкретной сенсорной модальности мысленного образа [12]. В случае моторного воображения также вовлекаются моторные отделы коры, такие как первичная моторная кора, премоторная кора, добавочные моторные области [27]. В сигнале ЭЭГ активация сенсомоторных областей коры характеризуется реакцией десинхронизации мю-ритма [6, 9, 10]. Эта реакция ЭЭГ характерна для задач на выполнение произвольных движений, моторное и тактильное воображение, а также при тактильной стимуляции [6, 7, 9, 10]. Для формирования контура обратной связи в нейроинтерфейсных технологиях необходимо знание кортикальной топологии реакций мю-ритма. В работах, где была исследована локализация источников мю-ритма при моторном воображении было показано, что ответственные за реакцию десинхронизации источники локализованы преимущественно в постцентральной извилине, т.е. в первичной соматосенсорной коре [32, 33]. В то же время в доступной литературе мы не нашли подобных работ, посвященных тактильному воображению.

Настоящее исследование было нацелено на определение локализации источников десинхронизации мю-ритма ЭЭГ при тактильном воображении и тактильной стимуляции, определение участия прецентральной и постцентральной областей коры в этом процессе, а также на сравнение профилей корковой активации при реальном тактильном ощущении и при его мысленном представлении.

Материалы и методы

Участники исследования. 22 здоровых добровольца (праворукие, 12 женщин, средний возраст $22 \pm 3,7$ лет) приняли участие в исследовании. Все испытуемые дали свое информированное согласие на участие в исследовании. Регламент исследования был одобрен этическим комитетом МГУ имени М.В. Ломоносова.

Регламент исследования. Длительность экспериментальной сессии составила 90 мин, включая подготовительные процедуры. Участники выполняли последовательно две задачи на сенсомоторную активацию (экспериментальные условия): 1) вибротактильная стимуляция большого пальца правой руки и 2) мысленное представление тактильных ощущений на том же пальце (тактильное воображение). Вибротактильная стимуляция осуществлялась при помощи вибротактильного стимулятора на базе микроконтроллера Arduino Uno (Arduino, Италия), диаметр стимулирующей поверхности составил 6 мм, длительность пачки стимуляции — 6 с; длительность одиночного стимула — 100 мс; частота вращения вибрационного мотора — 3700–12000 оборотов/мин; переменный межстимульный интервал — 50–350 мс. Подбор интенсивности стимуляции (частота вращения вибрационного мотора) проводился индивидуально для каждого испытуемого путем определения нижнего абсолютного порога чувствительности. Значение порога находилось путем постепенного увеличения интенсивности стимуляции до тех пор, пока участник исследования не докладывал о возникновении ощущения. Итоговая интенсивность стимуляции составляла 120% от порогового значения. Задача на тактильное воображение заключалась в мысленном воспроизведении ощущений на поверхности кожи, получаемых при вибротактильной стимуляции.

Каждое состояние включало в себя по 30 проб сенсомоторной (СМР) задачи, и столько же для контрольного состояния. В качестве контрольного состояния использовалась задача на зрительный счет элементов абстрактного изображения. Участники исследования заранее были обучены методике тактильного воображения и принимали участие в аналогичных исследованиях [7].

Регистрация данных. 128-канальная ЭЭГ регистрировалась с частотой оцифровки 1 кГц с использованием усилителя actiChamp+ (Brain Products, Германия). Активные Ag/AgCl электроды были расположены в соответствии с системой

10/05. В качестве референтного электрода использовался электрод в позиции TP10. Значения сопротивления между кожей и электродами не превышали 10 кОм. Данные регистрировались при помощи программного обеспечения BrainVision Recorder (Brain Products, Германия), синхронизированной со средой предъявления стимулов, реализованной при помощи пакета PsychoPy [34].

Все участники исследования прошли структурное анатомическое сканирование головного мозга (проводилось отдельно от экспериментальной сессии). Сканирование осуществлялось в магнитно-резонансном томографе (Siemens, Германия) с максимальной магнитной индукцией 1,5 Тл. При сканировании осуществлялась импульсная последовательность T1-взвешенного градиентного эхо «MP-RAGE» (время повторения = 10,1 мс; время эхо – 4,9 мс; матрица – 512 × 512; размер вокселя – 0,5 × 0,5 × 1,2 мм³; общее количество срезов 320). Полученные трехмерные изображения использовались для получения сегментированной модели головного мозга и локализации источников сенсомоторной ЭЭГ-активности.

Анализ данных. Предобработка, анализ и визуализация данных осуществлялись с использованием авторских скриптов в среде MNE Python [35]. Для сырых ЭЭГ-данных осуществлялся пересчет референтного электрода на среднее по всем каналам (CAR, Common Average Reference) [36], после чего сигнал был отфильтрован в диапазоне 1–30 Гц с использованием фильтра с конечной импульсной характеристикой. Для фильтрации сетевой наводки использовался режекторный фильтр 50 Гц. Каналы с высоким уровнем шума и большим числом артефактов (оценивались визуально) были интерполированы методом сферических сплайнов [37]. Для фильтрации глазодвигательных артефактов использовался метод независимых компонент (ICA, Independent Component Analysis). Для идентификации движений глаз в качестве электроокулограммы (ЭОГ) использовалась фронтальная группа каналов (Fp1, Fp2, AFp1, AFp2, AF7, AF8). Предобработанный сигнал был разделен на эпохи (0–6) с относительно начала пробы для каждого экспериментального состояния, включая контрольное.

Для оценки сенсомоторной активации в частотном домене, спектральная плотность мощности вычислялась при помощи метода *multitaper* для каждой эпохи. Значения десинхронизации мю-ритма были рассчитаны для каждого канала как процентное изменение разности спектральных мощностей в СМР-условии и контрольном состоянии относительно спектральной мощности в контрольном состоянии:

$$ERD = \frac{P_{smr} - Prst}{Prst} \times 100\%,$$

где P_{smr} – медианная спектральная плотность мощности по эпохам в СМР-условиях (вибротак-

тильная стимуляция, тактильное воображение) в выбранном частотном диапазоне. $Prst$ – медианная спектральная плотность мощности по эпохам для контрольного состояния (зрительный счет). Значения коэффициента десинхронизации (ERD, Event-Related Desynchronization) рассчитывались для мю-ритма в диапазоне 10–13 Гц. Границы диапазона мю-ритма выбирались индивидуально на основе определения пиковой частоты в контрольном состоянии. Значения десинхронизации, полученные для каждого из каналов, использовались для топографического картирования сенсомоторной активации при вибротактильной стимуляции и тактильном воображении. Для выявления статистически значимых кластеров десинхронизации для каждого экспериментального условия выполнялся одновыборочный пермутационный тест Стьюдента (пермутационный t-тест) [38]. Число случайно сгенерированных путем перестановок выборок составило 20 000. Для локализации источников десинхронизации мю-ритма проводилось решение обратной задачи ЭЭГ с учетом индивидуальной геометрии мозга и его покровов. Геометрическая модель строилась на основе индивидуальных анатомических структурных МРТ-изображений. По данным МРТ для каждого участника рассчитывалась сетка конечных элементов, позволяющая задать распределение электропроводности по тканям мозга и его покровов, что необходимо для расчета распределения электрического потенциала по поверхности головы в зависимости от положения и ориентации генерирующего его токового диполя [39–41]. Сегментирование МРТ-изображений с учетом трех слоев (поверхность головы, костная ткань, ткань мозга) осуществлялось при помощи пакета FreeSurfer. В качестве координат положения ЭЭГ на поверхности головы использовались стандартные координаты системы 10/05 с учетом индивидуального размера головы. Обратная задача ЭЭГ рассчитывалась методом sLORETA [42], после чего плотность спектральной мощности источников в диапазоне мю-ритма определялась в период (0–6) с после начала пробы. Результирующие усредненные мощности источников при тактильном воображении/стимуляции и в контрольной задаче были затем использованы для вычисления величины десинхронизации. Значения десинхронизации были извлечены из пре- и постцентральной извилин [41] для последующего сравнения критерием Вилкоксона для связанных выборок.

Для получения усредненной по выборке участников ($N = 22$) модели головного мозга, индивидуальные топографические карты были переведены в усредненные топографические карты *fsaverage*. Статистически значимые кластеры десинхронизации в коре головного мозга вычислялись с использованием одновыборочного пермутационного теста Стьюдента (t-тест против нулевого уровня).

Результаты и обсуждение

Для оценки топографического распределения десинхронизации использовался показатель ERD, рассчитанный для обоих экспериментальных условий. В результате прохождения экспериментальных задач, у всех участников исследования наблюдалась типичная реакция десинхронизации (подавления) мю-ритма в диапазоне 10–13 Гц как при вибротактильной стимуляции, так и при тактильном воображении (рис. 1). Десинхронизация наблюдалась преимущественно в контралатеральном (левом) полушарии, в центральных отведениях, расположенных над сенсомоторными областями коры. Проведение пермутационного теста позволило выявить статистически значимые пространственные кластеры ($p < 0,01$), включающие ЭЭГ-каналы с наиболее выраженной десинхронизацией мю-ритма (таблица). При вибротактильной стимуляции, кластер со статистически значимым подавлением мю-ритма включал отведения FC5, C3, CP1, C1, C5, CP3, CCP5h, CPP3h, FCC5h, CCP3h (суммарно $n = 10$ отведений). При тактильном воображении наблюдаемый кластер включал каналы C3, CP5, CP3, CCP5h, FCC5h, CCP3h, CPP5h (суммарно $n = 7$ отведений). Наибольшая выраженность активации в условии вибротактильной стимуляции, по-видимому, объясняется большим вовлечением нейрональных структур сенсомоторной коры ответственных за генерацию ритмической активности, в то время как при воображении в отсутствие реального физического воздействия, меньший размер нейронального ансамбля вовлечен в реализацию задачи. Сниженная десинхронизация мю-ритма при воображении по сравнению с выполнением произвольных движений, также характерна для моторного воображения [6, 9]. Полученные результаты соотносятся со взглядом на воображение как на «ослабленное» сенсорное восприятие [12]. Также полученные результаты дополняют работу [7], в которой была впервые показана десинхронизация мю-ритма ЭЭГ, возникающая при тактильном воображении. В настоящем исследовании использовалось большее количество ЭЭГ-отведений, что позволило

наиболее точно локализовать паттерны сенсомоторной активации при тактильном воображении и стимуляции.

С целью определения локализации источников десинхронизации мю-ритма при тактильном воображении и вибротактильной стимуляции было проведено решение обратной задачи методом sLORETA. В пространстве источников были получены статистически значимые кластеры активации ($p < 0,01$), локализованные в центральных отделах коры больших полушарий, включая *g. precentralis* (прецентральная извилина), *g. postcentralis* (постцентральная извилина) контралатерального полушария (рис. 2). Расположение этих извилин соответствует первичной моторной коре (прецентральная извилина) и первичной соматосенсорной коре (постцентральная извилина).

Для количественной оценки выраженности десинхронизации в первичной моторной и первичной соматосенсорной коре, значения десинхронизации в пространстве источников были извлечены из прецентральной и постцентральной извилин соответственно. Из рис. 3 видно, что наиболее выраженной была десинхронизация в постцентральной извилине по сравнению со значениями, извлеченными из прецентральной извилины, как для тактильного воображения ($p < 0,01$), так и для вибротактильной стимуляции ($p = 0,03$).

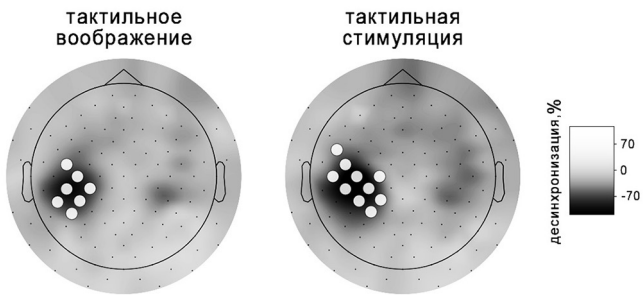


Рис. 1. Топографическое распределение выраженности десинхронизации мю-ритма при тактильном воображении и стимуляции (N = 22). Интенсивность серого цвета на картах пропорциональна величине десинхронизации. Светло-серые круги-маски соответствуют ЭЭГ-отведениям, для которых были обнаружены статистически значимые различия (результаты одновыборочного пермутационного теста Стьюдента; $p < 0,01$).

Таблица

Результаты одновыборочного пермутационного теста Стьюдента. Приведены уровни статистической значимости (p), значения t-статистики для ЭЭГ отведений (канал) со статистически значимой десинхронизацией мю-ритма при тактильном воображении и стимуляции

Тактильное воображение										
Канал	FCC5h	C3	CCP5h	CCP3h	CP5	CP3	CPP5h			
p	0,0002	0,0001	0,00004	0,00004	0,009	0,00004	0,008			
t-статистика	−4,53	−4,98	−5,30	−4,73	−4,66	−5,19	−4,60			
Тактильная стимуляция										
Канал	FC5	FCC5h	C5	C3	C1	CCP5h	CCP3h	CP3	CP1	CPP3h
p	0,0004	0,0003	0,0003	0,0001	0,0003	0,00004	0,00004	0,00004	0,0003	0,0003
t-статистика	−5,15	−5,48	−5,47	−6,15	−5,31	−6,86	−6,65	−6,63	−5,56	−5,55

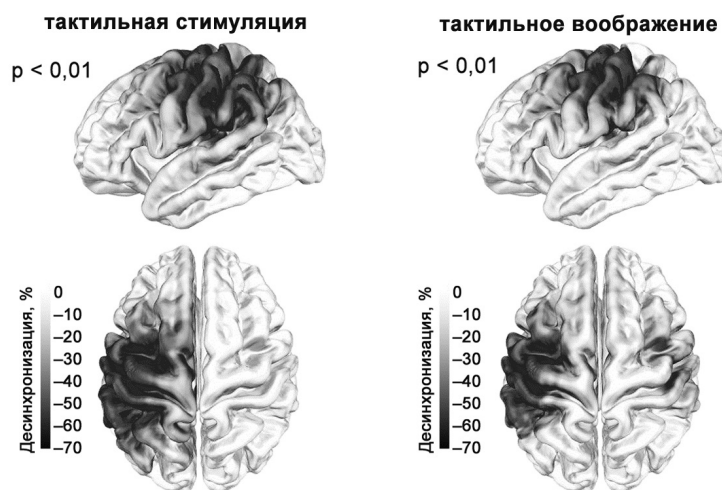


Рис. 2. Локализация источников десинхронизации мю-ритма в коре головного мозга при тактильном воображении и стимуляции (N = 22). Цветовая маска соответствует локализации статистически значимого кластера (результаты одновыборочного пермутационного теста Стьюдента; $p < 0,01$). Интенсивность цвета пропорциональна величине десинхронизации.

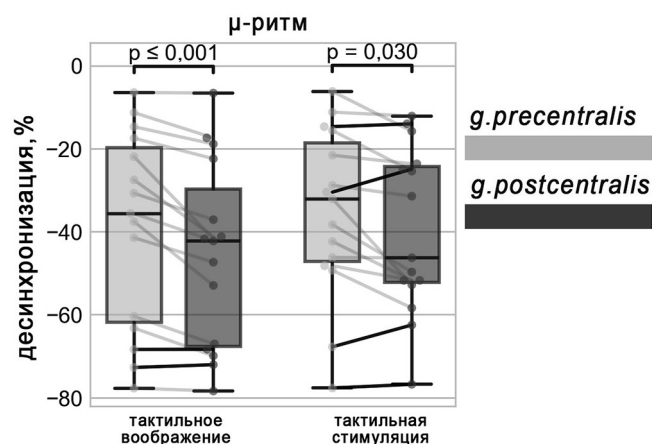


Рис. 3. Значения десинхронизации у участников исследования (N = 22) в экспериментальных состояниях для прецентральной и постцентральной извилины. Указан уровень статистической значимости для парного критерия Вилкоксона.

Наблюдаемые различия свидетельствуют о преимущественном вкладе первичной соматосенсорной коры в развитие реакции подавления мю-ритма при тактильном воображении и стимуляции. Сходные результаты были показаны для двигательного воображения [32, 33], что, по-видимому, объясняется вовлечением мысленных образов соматосенсорной модальности, ассоциированной с движением (в первую очередь — кинестетической или проприоцептивной). При этом вовлечение первичных сенсорных отделов коры в процесс воображения соответствует наблюдениям, полученным в исследованиях воображения различных сенсорных модальностей — зрительной [19–21], слуховой [44], обонятельной [45], вкусовой [46] и соматосенсорной [31].

Остается открытым вопрос различий в проявлении реакции десинхронизации мю-ритма ЭЭГ при двигательном и тактильном типах воображения. Несмотря на то, что в настоящей работе мо-

торное воображение не было одним из экспериментальных условий, исходя из результатов как наших собственных исследований [6, 7], так и работ, выполненных другими исследователями [9, 13], характер десинхронизации мю-ритма (его локализация, и амплитудно-временные характеристики) схожи для обоих типов воображения. Это проявляется как в пространстве сенсоров [6, 7, 9, 13], так и в пространстве источников [32, 33], что, судя по всему, объясняется преимущественным вкладом соматосенсорной компоненты при двигательном воображении в развитие десинхронизации мю-ритма. При этом, в работе Морозовой и соавт. было впервые показано более сильное фасилитирующее влияние кинестетического моторного воображения на кортикоспинальную возбудимость по сравнению с тактильным типом воображения [47]. Влияние воображения движений на кортикоспинальную возбудимость и десинхронизацию мю-ритма было изучено в других работах [48, 49], результаты которых показали отсутствие линейной связи в изменении этих параметров под влиянием воображения. Такие различия в эффектах воображения на рост кортикоспинальной возбудимости и десинхронизацию мю-ритма могут указывать на разные нейрофизиологические механизмы проявления этих феноменов и отсутствие прямых связей между их возникновением. Из этого следует, что для более точной оценки различий между двумя типами воображения (моторное, тактильное) перспективно проведение мультимодальной регистрации с использованием различных методов оценки функционального состояния коры больших полушарий, таких как транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС), функциональная спектроскопия ближнего поля (фБИКС).

Несмотря на то, что в настоящем исследовании были получены свидетельства активирующих эффектов тактильного воображения на сенсомо-

торные отделы коры, преимущественно в области постцентральной извилины, следует указать и некоторые ограничения работы. Основным ограничением является невозможность достоверно гарантировать строгое выполнение участками исследования задачи на тактильное воображение. В этой связи в будущих работах может стать полезным использование психометрических опросников, например, опросник на яркость тактильного воображения (Tactile Imagery Vividness Questionnaire, TIVQ), предложенный Ниерхаусом и коллегами [31]. Включение психометрической оценки при проведении исследований тактильного воображения может позволить получить субъективную оценку выраженности воображения в каждой попытке, а также получить представление об общей способности человека к тактильному воображению.

Заключение

Настоящее исследование было нацелено на определение локализации источников десинхронизации мю-ритма ЭЭГ при тактильном воображении и тактильной стимуляции, на определение участия прецентральной и постцентральной области коры в этом процессе, а также на сравнение профилей корковой активации при реальном тактильном ощущении и при его мысленном пред-

ставлении. Полученные в настоящей работе данные, свидетельствуют о вовлечении как первичной соматосенсорной, так и первичной моторной коры в процесс тактильного воображения, с преобладающим вкладом соматосенсорной коры. Десинхронизация мю-ритма при воображении сопоставима с десинхронизацией, вызванной реальной вибротактильной стимуляцией. Воображение в соматосенсорном домене может быть полезным для создания новых реабилитационных механизмов, направленных на индукцию нейропластичности в постинсультной реабилитации, лечении фантомных болей, а также может использоваться для создания новых контуров нейрокомпьютерного взаимодействия, как самостоятельной модальности, так и в дополнения к существующим подходам, основанным на воображении движений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-75-30024). Все испытуемые дали свое информированное согласие на участие в исследовании. Регламент исследования был одобрен этическим комитетом МГУ им. М.В. Ломоносова, заявка №30-ч одобрена (в редакции №2 от 11.03.2024), протокол заседания Комиссии №160-д-з от 21.03.2024. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каплан А.Я. Нейроинтерфейсные технологии: ожидания, достижения, перспективы. Технологии восстановления и расширения ресурсов мозга человека. *Публичный аналитический доклад*. Москва, Сколково: Лайм; 2020:152–171.
- Syrov N.V., Vasilyev A.N., Kaplan A. Sensorimotor EEG rhythms during action observation and passive mirror-box illusion. *International Conference on Human-Computer Interaction*. Cham: Springer International Publishing; 2021:101–106.
- Syrov N., Yakovlev L., Nikolaeva V., Kaplan A., Lebedev M. Mental strategies in a P300-BCI: Visuomotor transformation is an option. *Diagnostics*. 2022;12(11):2607.
- Vasilyev A.N., Nuzhdin Y.O., Kaplan A.Y. Does real-time feedback affect sensorimotor EEG patterns in routine motor imagery practice? *Brain Sci*. 2021;11(9):1234.
- Yakovlev L.V., Syrov N.V., Morozova E.Y., Kaplan A.Y. Corticospinal excitability in humans during motor imagery coupled with functional electrical stimulation. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2019;74:183–187.
- Yakovlev L., Syrov N., Kaplan A. Investigating the influence of functional electrical stimulation on motor imagery related μ -rhythm suppression. *Front. Neurosci*. 2023;17:1202951.
- Yakovlev L., Syrov N., Miroshnikov A., Lebedev M., Kaplan A. Event-related desynchronization induced by tactile imagery: An EEG study. *eNeuro*. 2023;10(6):ENEURO.0455-22.2023.
- Каплан А.Я. Нейрофизиологические основания и практические реализации технологии мозговых интерфейсов в неврологической реабилитации. *Физиол. чел*. 2016;42(1):118–127.
- Pfurtscheller G. Spatiotemporal ERD/ERS patterns during voluntary movement and motor imagery. *Suppl. Clin. Neurophysiol*. 2000;53:196–198.
- Neuper C., Wörtz M., Pfurtscheller G. ERD/ERS patterns reflecting sensorimotor activation and deactivation. *Prog. Brain Res*. 2006;159:211–222.
- McNorgan C. A meta-analytic review of multisensory imagery identifies the neural correlates of modality-specific and modality-general imagery. *Front. Hum. Neurosci*. 2012;6:285.
- Pearson J. The human imagination: the cognitive neuroscience of visual mental imagery. *Nat. Rev. Neurosci*. 2019;20(10):624–634.
- Neuper C., Scherer R., Reiner M., Pfurtscheller G. Imagery of motor actions: Differential effects of kinesthetic and visual-motor mode of imagery in single-trial EEG. *Cogn. Brain Res*. 2005;25(3):668–677.
- Stinear C. M., Byblow W.D., Steyvers M., Levin O., Swinnen S.P. Kinesthetic, but not visual, motor imagery modulates corticomotor excitability. *Exp. Brain Res*. 2006;168:157–164.
- Keogh R., Pearson J. Mental imagery and visual working memory. *PLoS One*. 2011;6(12):e29221.
- Keogh R., Pearson J. The sensory strength of voluntary visual imagery predicts visual working memory capacity. *J. Vis*. 2014;14(12):7.
- Palmiero M., Cardi V., Belardinelli M.O. The role of vividness of visual mental imagery on different dimensions of creativity. *Creat. Res. J*. 2011;23(4):372–375.

18. Amit E., Greene J.D. You see, the ends don't justify the means: Visual imagery and moral judgment. *Psychol. Sci.* 2012;23(8):861–868.
19. Sparing R., Mottaghy F.M., Ganis G., Thompson W.L., Töpper R., Kosslyn S.M., Pascual-Leone A. Visual cortex excitability increases during visual mental imagery—a TMS study in healthy human subjects. *Brain Res.* 2002;938(1–2):92–97.
20. Kosslyn S.M., Thompson W.L. When is early visual cortex activated during visual mental imagery? *Psychol. Bull.* 2003;129(5):723.
21. Slotnick S.D., Thompson W.L., Kosslyn S.M. Visual mental imagery induces retinotopically organized activation of early visual areas. *Cereb. Cortex.* 2005;15(10):1570–1583.
22. Wolpaw J.R., Birbaumer N., McFarland D.J., Pfurtscheller G., Vaughan T.M. Brain–computer interfaces for communication and control. *Clin. Neurophysiol.* 2002;113(6):767–791.
23. Ruffino C., Papaxanthis C., Lebon F. Neural plasticity during motor learning with motor imagery practice: Review and perspectives. *Neuroscience.* 2017;341:61–78.
24. Khan M.A., Das R., Iversen H.K., Puthusserypady S. Review on motor imagery based BCI systems for upper limb post-stroke neurorehabilitation: From designing to application. *Comput. Biol. Med.* 2020;123:103843.
25. Mane R., Chouhan T., Guan C. BCI for stroke rehabilitation: motor and beyond. *J. Neural. Eng.* 2020;17(4):041001.
26. Ladda A.M., Lebon F., Lotze M. Using motor imagery practice for improving motor performance—a review. *Brain Cogn.* 2021;150:105705.
27. Lotze M., Halsband U. Motor imagery. *J. Physiol. Paris.* 2006;99(4–6):386–395.
28. Yoo S.S., Freeman D.K., McCarthy III J.J., Jolesz F.A. Neural substrates of tactile imagery: a functional MRI study. *Neuroreport.* 2003;14(4):581–585.
29. Schmidt T.T., Ostwald D., Blankenburg F. Imaging tactile imagery: changes in brain connectivity support perceptual grounding of mental images in primary sensory cortices. *Neuroimage.* 2014;98:216–224.
30. Schmidt T.T., Blankenburg F. The somatotopy of mental tactile imagery. *Front. Hum. Neurosci.* 2019;13:10.
31. Nierhaus T., Wesolek S., Pach D., Witt C.M., Blankenburg F., Schmidt T.T. Content representation of tactile mental imagery in primary somatosensory cortex. *eNeuro.* 2023;10(6):ENEURO.0408-22.2023.
32. Salmelin R., Hari R. Spatiotemporal characteristics of sensorimotor neuromagnetic rhythms related to thumb movement. *Neuroscience.* 1994;60(2):537–550.
33. Frolov A.A., Husek D., Bobrov P.D., Mokienko O.A., Chernikova L.A., Konovalov R.N. Localization of brain electrical activity sources and hemodynamic activity foci during motor imagery. *Hum. Physiol.* 2014;40(3):273–283.
34. Peirce J.W. PsychoPy—psychophysics software in Python. *J. Neurosci. Methods.* 2007;162(1–2):8–13.
35. Gramfort A., Luessi M., Larson E., Engemann D.A., Strohmeier D., Brodbeck C., Goj R., Jas M., Brooks T., Parkkonen L., Hämäläinen M. MEG and EEG data analysis with MNE-Python. *Front. Neurosci.* 2013;7:70133.
36. McFarland D.J., McCane L.M., David S.V., Wolpaw J.R. Spatial filter selection for EEG-based communication. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1997;103(3):386–394.
37. Perrin F., Pernier J., Bertrand O., Echallier J.F. Spherical splines for scalp potential and current density mapping. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1989;72(2):184–187.
38. Maris E., Oostenveld R. Nonparametric statistical testing of EEG-and MEG-data. *J. Neurosci. Methods.* 2007;164(1):177–190.
39. Dale A.M., Sereno M.I. Improved localization of cortical activity by combining EEG and MEG with MRI cortical surface reconstruction: a linear approach. *J. Cogn. Neurosci.* 1993;5(2):162–176.
40. Fischl B., Van Der Kouwe A., Destrieux C., Halgren E., Ségonne F., Salat D.H., Busa E., Seidman L.J., Goldstein J., Kennedy D., Caviness V., Makris N., Rosen B., Dale A.M. Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cereb. Cortex.* 2004;14(1):11–22.
41. Desikan R.S., Ségonne F., Fischl B., Quinn B.T., Dickerson B.C., Blacker D., Buckner R.L., Dale A.M., Maguire R.P., Hyman B.T., Albert M.S., Killiany R.J. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage.* 2006;31(3):968–980.
42. Pascual-Marqui R.D. Standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA): technical details. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 2002;24(Suppl. D):5–12.
43. Pearson J., Naselaris T., Holmes E.A., Kosslyn S.M. Mental imagery: functional mechanisms and clinical applications. *Trends Cogn. Sci.* 2015;19(10):590–602.
44. Yoo S.S., Lee C.U., Choi B.G. Human brain mapping of auditory imagery: event-related functional MRI study. *Neuroreport.* 2001;12(14):3045–3049.
45. Djordjevic J., Zatorre R.J., Petrides M., Boyle J.A., Jones-Gotman M. Functional neuroimaging of odor imagery. *Neuroimage.* 2005;24(3):791–801.
46. Kobayashi M., Takeda M., Hattori N., Fukunaga M., Sasabe T., Inoue N., Nagai Y., Sawada T., Sadato N., Watanabe Y. Functional imaging of gustatory perception and imagery: “top-down” processing of gustatory signals. *Neuroimage.* 2004;23(4):1271–1282.
47. Morozova M., Nasibullina A., Yakovlev L., Syrov N., Kaplan A., Lebedev M. Tactile versus motor imagery: differences in corticospinal excitability assessed with single-pulse TMS. *Sci. Rep.* 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64665-6>
48. Kaplan A., Vasilyev A., Liburkina S., Yakovlev L. Poor BCI performers still could benefit from motor imagery training. *Foundations of Augmented Cognition: Neuroergonomics and Operational Neuroscience: 10th International Conference, AC 2016, Held as Part of HCI International 2016, Toronto, ON, Canada, July 17–22, 2016, Proceedings, Part I 10.* Springer International Publishing; 2016:46–56.
49. Vasilyev A., Liburkina S., Yakovlev L., Perepelkina O., Kaplan A. Assessing motor imagery in brain-computer interface training: psychological and neurophysiological correlates. *Neuropsychologia.* 2017;97:56–65.

Поступила в редакцию 03.04.2024

После доработки 23.05.2024

Принята в печать 15.06.2024

RESEARCH ARTICLE

Source localization of mu-rhythm event related desynchronization in EEG during tactile imagery

L.V. Yakovlev^{1,2,*} , N.V. Syrov² , A.A. Miroshnikov¹ , M.V. Morozova² ,
A.M. Berkush-Antipova³ , D.A. Petrova² , A.Y. Kaplan^{1,2} 

¹Laboratory of Neurophysiology and Neurocomputer Interfaces, Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Vladimir Zelman Center for Neurobiology and Neurorehabilitation, Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoy Boulevard 30–1, Moscow, 121205, Russia;

³Baltic Center for Neurotechnology and Artificial Intelligence, Immanuel Kant Baltic Federal University, A. Nevskogo 14, Kaliningrad, 236041, Russia

*e-mail: lejackovlev@gmail.com

Tactile imagery remains a relatively understudied phenomenon in the field of mental imagery research. However, alongside motor imagery, this technique holds promise as an effective tool for sensorimotor rehabilitation following stroke and spinal cord injuries. In this study, conducted with 22 healthy volunteers, we investigated the source localization of mu-rhythm event related desynchronization (Event-Related Desynchronization, ERD) using multi-channel electroencephalogram recordings and subsequent inverse problem solution with the sLORETA method. All participants exhibited ERD during tactile imagery task, as well as under vibrotactile stimulation. It was demonstrated that mu-rhythm ERD during vibrotactile stimulation, as well as tactile imagery, was localized in the sensorimotor areas of the contralateral hemisphere. Within the source space, ERD in the postcentral gyrus was significantly stronger compared to the precentral gyrus. These findings indicate that tactile imagery, akin to the perception of real tactile stimuli, leads to prominent activation of sensorimotor cortical areas, consistent with the general understanding of the shared neural substrate during mental imagery and perception.

Keywords: sensorimotor rhythm, mu-rhythm, event-related desynchronization, tactile imagery, source localization, inverse task

Funding: The study was financially supported by the Russian Science Foundation (project No. 21-75-30024).

Сведения об авторах

Яковлев Лев Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. центра нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: lejackovlev@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6609-8176>

Сыров Николай Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. центра нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kolascoco@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8253-9426>

Мирошников Андрей Алексеевич — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: miroshnikovaa@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9497-2120>

Морозова Марина Витальевна — аспирант Сколковского института науки и технологий. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: m.morozova@skoltech.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0529-8777>

Беркуш-Антипова Артемий Михильевич — студент Балтийского центра нейротехнологий и искусственного интеллекта БФУ им. И. Канта. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: artemgantipov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9350-0845>

Петрова Дарья Андреевна — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. центра нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: d.petrova@skoltech.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6803-1717>

Каплан Александр Яковлевич — докт. биол. наук, зав. лабораторией нейрофизиологии и нейрокомпьютерных интерфейсов кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: akaplan@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3912-4639>

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных РИНЦ, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, английская — в Scopus, SCImago, EBSCO Discovery Service, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Central, AGRICOLA, EMBiology, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Dimensions, Google Scholar и др. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ русскоязычной версии в 2021 г. составляет 0,778, показатель CiteScore 2022 (Scopus) англоязычной версии — 0,9.

После принятия статьи в печать редакция высылает авторам договоры с издателем журнала, которые необходимо заполнить и подписать всем соавторам. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько — по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал — полусторонний, отступ — 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается [шаблон статьи](#)). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). Объёмы, значительно отклоняющиеся от рекомендованных, необходимо согласовывать с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (полужирным шрифтом, кегль 14), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера

Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}

¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение, список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным

шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение – нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке: «Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где указывается дата отправки рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:

Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis

N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}

¹*Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;*

²*Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia*

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

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке:

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-000000000000-0).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович – канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков не должно быть избыточным (рекомендуется приводить не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное реальное (не интерполированное!) разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого его смысл не терялся и все элементы были различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Список литературы оформляется в соответствии с форматом Vancouver. Указатель литературы к статьям формируется в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту. Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и пристатейного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название журнала* (принятый сокращенный вариант). Год;том(номер):страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). *Название книги*. Город: Название издательства (без кавычек); год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название сборника*. Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Название издательства (без кавычек); год:страницы.

4) **Электронный ресурс.** *Название сайта* [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). [Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана].

5) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс]. *Название источника*. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.*; *Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, *Journal of Biochemistry* — *J. Biochem.* и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Litchfield K., Reading J.L., Puttick C., Thakkar K., Abbosh C., Bentham R., Watkins T.B., Rosenthal R., Biswas D., Rowan A., Lim E. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition. *Cell*. 2021;184(3):596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes. *PloS One*. 2020;15(4):e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеенко А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённых А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости. *Комп. исслед. моделир.* 2020;12(6):1383–1395.

Книга:

Holliday R. *Aging: the paradox of life: why we age*. Dordrecht: Springer; 2007. 132 pp.

Рязанова Г.И. *Поведение насекомых*. М.: Изд-во Моск. ун-та; 2019. 232 с.

Статья в сборнике:

Mahajan M., Yadav R.K. Labeling and sorting of Arabidopsis SAM cell populations to capture their transcriptome profile. *Plant Stem Cells: Methods and Protocols*, vol. 2094. Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana; 2020:39–47.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв. *Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.)*. Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии; 2013:174–176.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.03.2021).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.02.2021).

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.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Дополнительные правила оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м — метр, кг — килограмм, мин — минута, ° — градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия — NaCl, углекислый газ — CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов — обычным шрифтом. Например: ген — *FOXO3*, его продукт — FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется редколлегией на соответствие профилю и правилам оформления журнала. На первичное рассмотрение отводится 7–10 дней. Если в оформлении статьи обнаруживаются ошибки, ее рассмотрение занимает больше времени, так как редакторам необходимо составить список недочетов. Если работа совсем не соответствует требованиям, она возвращается авторам без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Рецензирование занимает от двух недель до месяца. Срок рецензирования включает в себя не только непосредственную работу рецензентов с рукописью, но и поиск подходящих специалистов (поиск может занять от двух дней до двух недель). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Возможно несколько раундов рецензирования, если у рецензентов возникают новые замечания или они не согласны с исправлениями и ответами авторов. Далее над рукописью работают редакторы, исправленный текст и замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Важно: если авторы подают статью, написанную на английском языке в русскоязычную версию журнала, она публикуется только в этой версии и не публикуется в переводной версии (Moscow University Biological Science Bulletin). Для подачи статьи в переводную версию, необходимо воспользоваться системой сайта Pleiades Publishing (<https://www.pleiades.online/ru/journal/bbscimgu/>).

Полезные ссылки

Список сокращенных названий журналов можно найти [здесь](#)

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

О том, как правильно сокращать общепринятые термины, можно прочитать [здесь](#)