

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционный совет

В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
В.М. Говорун – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)
И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук, доцент (Россия)
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)
Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук, доцент (Россия)
В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Долгих – канд. биол. наук (Россия)
Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Л. Киселев – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.А. Козлов – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)
И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Н.А. Проворов – д-р биол. наук (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Ратушный – канд. биол. наук (США)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

Founders

Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial council

V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan

G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

V.M. Govorun, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany

S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil

L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands

V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia

V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States

A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia

A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States

S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States

I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

T.G. Amstislavskaya, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia, Netherlands

S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.A. Dolgikh, Cand. Sci. (Biology), Russia

N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

T.A. Gavrilenko, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.L. Kiselev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Kozlov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany

I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany

L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia

M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.A. Provorov, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States

E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

757

ОТ РЕДАКТОРА

Биоресурсные коллекции
лабораторных животных
М.П. Мошкин

Геномика и генная инженерия

758

МЕТОДЫ И ПРОТОКОЛЫ

Манипуляции с ранними
эмбрионами мыши для создания
генетически модифицированных
животных
А.Н. Кораблев, И.А. Серова, Б.В. Скрыбин

764

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Сравнительный анализ активности
лактапина, полученного в про-
и эукариотических системах
экспрессии
*О.А. Коваль, О.Ю. Волкова, А.А. Горчаков,
С.В. Кулемзин, А.В. Ткаченко, А.А. Нуштаева,
Е.В. Кулигина, В.А. Рухтер, А.В. Таранин*

770

ОБЗОР

Использование геномных данных
в селекции птицы
А.Ф. Яковлев, Н.В. Дементьева

778

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ассоциация числа копий
эндогенных ретровирусов типа А
с гематологическими показателями
и полом у мини-свиней
*Р.Б. Айтназаров, С.В. Никитин, Г.В. Концевая,
М.И. Воевода, Н.С. Юдин*

Высокотехнологическое фенотипирование

783

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Магнитно-резонансная
спектроскопия нейрометаболитов
гиппокампа и стриатума
при синдроме посттравматических
стрессорных расстройств
*В.Э. Цейликман, О.Б. Шевелев, Н.В. Хоцкин,
А.С. Доценко, Г.В. Концевая, М.С. Лапшин,
М.П. Мошкин, М.В. Комелькова, И.В. Фекличева,
О.Б. Цейликман, И.В. Дременков, Е.Л. Завьялов*

788

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поведенческие и нейрональные
реакции на кон- и гетеро-
специфические обонятельные
сигналы у двух видов мышей –
Mus musculus и *Mus spicilegus*
Е.В. Котенкова, А.В. Ромащенко, А.Н. Мальцев

795

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Особенности распределения
электролитов в различных тканях
у миниатюрных свиней
*А.В. Фатьянова, В.А. Лавриненко,
О.В. Трапезов, Н.С. Юдин*

798

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Экспрессия генов системы
катехоламинов в среднем мозге
и реакция престаимпульного
торможения у крыс
с генетической кататонией
*М.А. Рязанова, О.И. Прокудина, В.С. Плеканчук,
Т.А. Алехина*

804

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние нокаута гена *Zbtb33*
и бактериального липополисахарида
на поведение в домашней клетке
у мышей
Н.В. Хоцкин, И.Е. Сорокин, Е.А. Куликова, А.В. Куликов

810

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Сравнение преимплантационного
развития эмбрионов крыс
линий OXYS и WAG
в условиях *in vivo* и *in vitro*
*В.В. Кожевникова, Т.Н. Игонина, Е.Ю. Брусенцев,
В.И. Мокроусова, Е.А. Кизилова, И.Н. Рожкова,
В.А. Напримеров, С.Я. Амстиславский*

Тест-системы и биоиспытания

816

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Связь между фенотипической
робастностью и средней
продолжительностью жизни
у *Drosophila melanogaster*
*Л.П. Захаренко, Д.В. Петровский, И.Г. Дранов,
С.А. Федорова, Н.С. Юдин, А.В. Пиндюрин,
Ю.М. Мошкин*

825

ОБЗОР

Нейроэндокринная стресс-реакция
насекомых: история развития
концепции
М.А. Еремина, Н.Е. Грунтенко

833

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Половые различия молекулярных
механизмов чувствительности
к инсулину у молодых и взрослых
мышей C57BL/6J
*Т.В. Яковлева, А.Ю. Казанцева, Е.Н. Макарова,
Н.М. Бажан*

841

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Изменение метаболических показателей и двигательной активности у лабораторных мышей под воздействием микроводорослей (*Chlorella vulgaris*)

Е.Л. Завьялов, Д.В. Петровский, Г.В. Концевая,
В.В. Мак, И.П. Уваров, Я.Л. Завьялова, О.А. Рожков

848

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Эффективность ольфакторного транспорта аморфных и кристаллических наночастиц оксидов марганца

А.В. Ромащенко, Д.В. Петровский, М.Б. Шарапова,
Ю.М. Мошкин, К.Э. Купер, К.Н. Морозова,
Е.В. Киселева, М.П. Мошкин

Клеточные модели заболеваний

856

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Моделирование болезни Хантингтона на клетках линии НЕК293

Д.В. Шарипова, Т.Б. Маланханова, А.А. Малахова

Генодиагностика у растений

862

МЕТОДЫ И ПРОТОКОЛЫ

Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний

Е.С. Сколотнева, И.Н. Леонова, Е.Ю. Букалич,
Е.А. Салина

- 757 **FROM THE EDITOR**
Bioresource collections
of laboratory animals
M.P. Moshkin

Genomics and gene engineering

- 758 **METHODS AND PROTOCOLS**
Manipulations with early
mouse embryos for generation
of genetically modified animals
A.N. Korablev, I.A. Serova, B.V. Skryabin
- 764 **ORIGINAL ARTICLE**
Comparative analysis of lactaptin
activity when produced in bacterial
or eukaryotic expression systems
*O.A. Koval, O.Y. Volkova, A.A. Gorchakov, S.V. Kulemzin,
A.V. Tkachenko, A.A. Nushtaeva, E.V. Kuligina,
V.A. Richter, A.V. Taranin*

- 770 **REVIEW**
Evaluation of the genome in bird
breeding
A.F. Yakovlev, N.V. Dement'eva

- 778 **ORIGINAL ARTICLE**
An association between type A
porcine endogenous retrovirus copy
number and hematological parameters
and gender in miniature pigs
*R.B. Aitnazarov, S.V. Nikitin, G.V. Kontsevaya,
M.I. Voevoda, N.S. Yudin*

High-technology phenotyping

- 783 **ORIGINAL ARTICLE**
Magnetic resonance spectroscopy
of hippocampal and striatal
neurometabolites in experimental
PTSD rat modeling
*V.E. Tseilikman, O.B. Shevelev, N.V. Khotskin,
A.S. Dotsenko, G.V. Kontsevaya, M.S. Lapshin,
M.P. Moshkin, M.V. Komelkova, I.V. Feklicheva,
O.B. Tseilikman, E. Dremencov, E.L. Zavjalov*

- 788 **ORIGINAL ARTICLE**
Behavioral and neuronal responses
of two mouse species, *Mus musculus*
and *Mus spicilegus*, to con- and
heterospecific olfactory signals
E.V. Kotenkova, A.V. Romashchenko, A.N. Maltsev

- 795 **ORIGINAL ARTICLE**
Features of the electrolyte distribution
in various tissues in miniature pigs
*A.V. Fatianova, V.A. Lavrinenko, O.V. Trapezov,
N.S. Yudin*

- 798 **ORIGINAL ARTICLE**
Expression of catecholaminergic genes
in the midbrain and prepulse inhibition
in rats with a genetic catatonia
*M.A. Ryazanova, O.I. Prokudina, V.S. Plekanchuk,
T.A. Alekhina*

- 804 **ORIGINAL ARTICLE**
Effect of *Zbtb33* gene knockout and
bacterial lipopolysaccharide on home
cage behavior in mice
N.V. Khotskin, I.E. Sorokin, E.A. Kulikova, A.V. Kulikov

- 810 **ORIGINAL ARTICLE**
Comparison of *in vivo* and *in vitro*
preimplantation embryo development
in OXYS and WAG rats
*V.V. Kozhevnikova, T.N. Igonina, E.Yu. Brusentsev,
V.I. Mokrousova, E.A. Kizilova, I.N. Rozhkova,
V.A. Naprimerov, S.Ya. Amstislavsky*

Test systems and biotests

- 816 **ORIGINAL ARTICLE**
A link between phenotypic robustness
and life expectancy in *Drosophila*
melanogaster
*L.P. Zakharenko, D.V. Petrovskii, I.G. Dranov,
S.A. Fedorova, N.S. Yudin, A.V. Pindyurin, Y.M. Moshkin*

- 825 **REVIEW**
The neuroendocrine stress-
response in insects: the history
of the development of the concept
M.A. Eremina, N.E. Gruntenko

- 833 **ORIGINAL ARTICLE**
Sex differences of molecular
mechanisms of insulin sensitivity
in young and adult C57BL/6J mice
*T.V. Yakovleva, A.Yu. Kazantseva, E.N. Makarova,
N.M. Bazhan*

841

ORIGINAL ARTICLE

Metabolic and motor activity effects of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in laboratory mice

E.L. Zavjalov, D.V. Petrovskii, G.V. Kontsevaya, V.V. Mak, I.P. Uvarov, Y.L. Zav'yalova, O.A. Rozhkov

848

ORIGINAL ARTICLE

Olfactory transport efficiency of the amorphous and crystalline manganese oxide nanoparticles

A.V. Romashchenko, D.V. Petrovskii, M.B. Sharapova, Y.M. Moshkin, K.E. Kuper, K.N. Morozova, E.V. Kiseleva, M.P. Moshkin

Cell-based models of diseases

856

ORIGINAL ARTICLE

Huntington's disease modeling on HEK293 cell line

D.V. Sharipova, T.B. Malankhanova, A.A. Malakhova

Gene diagnostics in plants

862

METHODS AND PROTOCOLS

Methodical approaches to identification of effective wheat genes providing broad-spectrum resistance against fungal diseases

E.S. Skolotneva, I.N. Leonova, E.Yu. Bukatich, E.A. Salina

Биоресурсные коллекции лабораторных животных

Одно из центральных направлений пост-геномной биологии, сформировавшееся в ходе реализации геномного проекта, заключается в фенотипической аннотации всей совокупности генов млекопитающих. Решение этой грандиозной задачи требует модельных организмов с различными генетическими свойствами, что ведет к стремительному росту разнообразия лабораторных животных. Предполагается, что через 20 лет число генетических линий мышей превысит 300 тысяч (Abbott, Harbor, Nature, 2004). Уже сегодня совокупный объем мировых депозитариев содержит более 220 тысяч генотипов мышей, представленных главным образом линиями эмбриональных стволовых клеток, из которых не составляет труда получить полноценные организмы. Для сохранения и эффективного использования этого рукотворного биоразнообразия во всех развитых странах создан новый класс биологических коллекций – так называемые Центры генетических ресурсов лабораторных животных.

Упомянутая статья Abbott и Harbor была написана в 2004 г., до появления новых технологий геномного редактирования, в частности CRISPR/Cas9, которые начали широко внедряться после 2010 г. и которые более чем в три раза сократили сроки получения новых линий мышей. Поэтому особенно актуальным стал вопрос о хранении и информационном упорядочении коллекционных фондов. Как отмечается в статье Lloyd et al. “Reproducibility: Use mouse biobanks or lose them” (Nature, 2015), свыше 50 % трансгенных линий мышей были созданы независимыми научными группами по два раза и более. Востребованность лабораторных животных современной наукой подтверждается сайтом PubMed, который при запросе словосочетаний *laboratory mouse* и *transgenic mouse* выдает 1 491 600 и 222 103 цитирований соответственно. Вклад экспериментов на лабораторных мышах в получение прорывных научных результатов красноречиво проиллюстрирован тем фактом, что работы 26 нобелевских лауреатов были выполнены с использованием ресурсов Джексонской лаборатории (Jackson Laboratory, USA).

Еще один стимул к расширению спектра генетических линий лабораторных животных – провозглашенное современным здравоохранением развитие персонализированной медицины. Этот девиз формирует запрос на разнообразие экспериментальных животных, моделирующих

различные варианты патологий, как основы для успешного поиска индивидуально ориентированных средств диагностики, профилактики и лечения болезней. Для большинства хронических неинфекционных заболеваний, имеющих полиэтиологическую природу, наиболее оправданным представляется двусторонний скрининг лекарственных препаратов, в рамках которого множество тестируемых соединений комбинируют со множеством модельных организмов. Для этих целей создают и поддерживают большое количество генетических линий мышей. Так, в одной только Джексонской лаборатории число линий, относящихся к заболеваниям различных систем организма, составляет: 2399 для нейропатологий; 2218 для заболеваний иммунной системы; 1920 для сердечно-сосудистых нарушений; 1900 для онкологии. Сопоставимое число моделей патологий поддерживают и Биоресурсный центр общества РИКЕН (BRC RIKEN, Japan), и Европейский архив мутантных мышей (The European Mouse Mutant Archive, EC).

Российская наука также включилась в работу по созданию генетического разнообразия лабораторных животных как необходимого условия обеспечения мирового уровня исследований в области фундаментальной биологии и биомедицины. Благодаря инициативе нашего института «Формирование сети национальных центров генетических коллекций лабораторных животных для моделирования патологий человека и испытаний новых лекарственных препаратов» было включено в список из восьми направлений, поддержанных в 2014–2015 гг. Министерством образования и науки РФ в качестве приоритетных научных задач. Продолжением этой работы послужило создание в Федеральном агентстве научных организаций (ФАНО) России программы поддержки «Биоресурсных коллекций (БРК)», которую возглавляет академик Н.А. Колчанов. Лабораторные животные являются заметной частью БРК ФАНО. Работа БРК любого профиля складывается из трех видов деятельности: поддержание коллекционного фонда, его пополнение и продвижение, или популяризация объектов коллекционного хранения. В приложении к лабораторным животным эти виды деятельности выражаются: в развитии методов криоархивирования редеривации и контроля качества животных; разработке алгоритмов получения генетических линий из внешних депозитариев, создании новых генотипов путем селекции и генной инженерии; изучении морфофункциональных особенностей новых модельных организмов; демонстрации возможностей проведения биоиспытаний на коллекционных объектах.

Предлагаемый в данном выпуске журнала цикл статей содержит конкретные результаты, полученные в работах по генной инженерии, высокотехнологическому фенотипированию и биоиспытаниям.

М.П. Мошкин,

д-р биол. наук, профессор, научный редактор выпуска

Манипуляции с ранними эмбрионами мыши для создания генетически модифицированных животных

А.Н. Кораблев¹✉, И.А. Серова¹, Б.В. Скрыбин²

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

² Вестфальский университет имени Вильгельма, медицинский факультет, сектор трансгенных животных, Мюнстер, Германия

За последнее время технологии редактирования генома стали более эффективными и доступными. Открытие нуклеаз для направленного редактирования геномов (CRISPR/Cas9, TALEN, ZFNs) значительно ускорило и упростило получение мышей с адресными направленными изменениями в геноме. В настоящее время наиболее популярной системой является CRISPR/Cas9 благодаря своей простоте и высокой эффективности. Технологию CRISPR/Cas9 эффективно используют для «нокаутирования» генов, получения масштабных делеций или направленных инсерций в целевых участках генома на эмбриональных стволовых клетках (ЭСК). Такие генетически модифицированные ЭСК после инъекции их в полость бластоцист способны генерировать развитие и рождение химерных животных, у которых часть гамет имеет идентичный генотип ЭСК. Таким образом, среди потомства химерных животных рождаются мыши с модифицированными геномами. Недавно технология CRISPR/Cas9 была успешно применена на зиготах, что существенно сократило время получения животных с необходимыми генетическими модификациями. Несмотря на то что современные технологии редактирования генома упрощают получение генно-модифицированных животных, данная технология остается сложной в воспроизведении и имеет множество тонкостей из-за методов и техник работы с ранними эмбрионами. Вследствие этого для исследователя, работающего в области получения генно-модифицированных животных, важно использование современных технологий и совершенное владение эмбриологическими техниками. В настоящей статье описаны протоколы микроинъекции в пронуклеус или цитоплазму зигот, подготовка растворов для микроинъекции, а также методы инъекции ЭСК в полость бластоцисты. Помимо этого, приведены протоколы для работы с мышами, а именно: суперовуляция и подготовка гормонов, получение эмбрионов на ранних стадиях (зиготы и бластоцисты), подготовка вазектомизированных самцов и суррогатных матерей, трансплантация эмбрионов в яйцевод или матку. Отдельно приводится сборка и необходимые составляющие наркозного аппарата для изофлуранового наркоза и проведение общей анестезии.

Ключевые слова: трансгенез; инъекция в зиготу; эмбриональные стволовые клетки (ЭСК); инъекция ЭСК в бластоцисту; трансплантация эмбрионов.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кораблев А.Н., Серова И.А., Скрыбин Б.В. Манипуляции с ранними эмбрионами мыши для создания генетически модифицированных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):758-763. DOI 10.18699/VJ17.291

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Korablev A.N., Serova I.A., Skryabin B.V. Manipulations with early mouse embryos for generation of genetically modified animals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):758-763. DOI 10.18699/VJ17.291 (in Russian)

Received 29.09.2017
Accepted for publication 23.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: korablev@bionet.nsc.ru

Manipulations with early mouse embryos for generation of genetically modified animals

A.N. Korablev¹✉, I.A. Serova¹, B.V. Skryabin²

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² University of Muenster, Faculty of Medicine, Transgenic animal and genetic engineering Models (TRAM), Muenster, Germany

Recently, genome-editing technologies have become more efficient and accessible. The discovery of nucleases for directional genome editing (CRISPR/Cas9, TALEN, ZFNs) significantly accelerated and simplified the production of mice with targeted gene editing in the genome. Until last time, the CRISPR/Cas9 system noticeably simplified the preparation of knockout or transgenic mice. CRISPR/Cas9 technology was successfully applied for gene knockout and knock-in, generation of large deletions or directed insertions in targeted genome regions in embryonic stem cells (ESCs). When injected into blastocysts, such modified ESCs are able to generate chimeras producing gametes with an identical genotype with ESC. Thus, it can identify animals with modified genomes. More recently, CRISPR/Cas9 technology was successfully applied to mouse zygotes and the birth of genetic modified mice was observed, i.e., the time required for generating genome-modified animals decreased significantly. The CRISPR/Cas9 system allows making gene knockout, large deletions or directed insertions into the target region of the genome by cytoplasm or pronuclear microinjection into zygotes. In addition, this is faster and simpler than similar work with mouse ESCs. Meanwhile, methods of manipulation with early embryos and their transplantation to surrogate mothers may be somewhat tricky. Therefore, it is important to use modern technologies for directional genome editing and perfect mastery in the embryological technics. In this article, we describe the protocols of microinjection into the pronucleus or cytoplasm of zygotes and injection of embryonic stem cells into the blastocyst cavity. We also describe embryological methods, such as superovulation, preparation of early stage embryos, surgical operation, production of foster mice. In addition, we describe the assembly and necessary components for the isoflurane anesthetic apparatus and isoflurane anesthesia.

Key words: transgenesis; zygote injection; embryonic stem cells (ESCs); injection of ESCs into blastocyst; embryotransfer.

В последнее время с появлением нуклеаз для редактирования геномов (CRISPR/Cas9, TALEN, ZFNs) значительно упростилось получение мышей с направленными изменениями в геноме (Sung et al., 2013; Yang et al., 2014). Однако мало изменились способы манипуляций с эмбрионами и работы с животными, поэтому такие методы могут быть одними из лимитирующих в получении нокаутных и трансгенных мышей.

Классическим путем получения мышей с целевыми модификациями генома является инъекция эмбриональных стволовых клеткок (ЭСК) в полость бластоцисты и рождение химер. Первым шагом к развитию данной технологии было выделение ЭСК из внутренней клеточной массы бластоцисты (стадии 3.5 дня после коитуса) (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Затем в 1984 г. была показана возможность получения химерных мышей путем инъекции ЭСК в полость бластоцист. Химерные животные, в свою очередь, способны продуцировать гаметы генотипа, идентичного ЭСК, и тем самым передавать его потомкам (Bradley et al., 1984). Вскоре была осуществлена гомологичная рекомбинация между экзогенной ДНК и эндогенной ДНК хромосомы в клетках млекопитающих (Lin et al., 1985). Все это позволило получить первую нокаутную мышь из ЭСК с инсерцией рекомбинантной ДНК (несущей селективный ген) в целевой ген путем их инъекции в полость бластоцисты для получения химерных мышей. Потомство, полученное от химерных мышей, имело нокаутную мутацию в целевом гене (Caprecchi, 1989).

Постепенно данная технология совершенствовалась и, что важно, не потеряла актуальности и сегодня. Так, например, применение пьезодремли при инъекции ЭСК в бластоцисту значительно упростило технику инъекции ЭСК в полость бластоцисты (Kawase et al., 2001). Позже был разработан трудоемкий, но эффективный метод тетраплоидной комплементации (инъекции диплоидных ЭСК в тетраплоидные бластоцисты), который позволяет получать рождение генетически модифицированных животных, развившихся из экспериментальных бластоцист, имеющих генотип диплоидных ЭСК клеток (Wang, Jaenisch, 2004).

В статье (Dupont et al., 2017) опубликован интересный способ повышения уровня химеризма с участием ЭСК посредством обработки морул фактором FGF (fibroblast-growth factor), который смещает дифференцировку бластомеров в сторону фибробласта, и, как следствие, клеток внутренней клеточной массы становится меньше. Инъекцированные в такие бластоцисты ЭСК с большей эффективностью заселяют внутреннюю клеточную массу, тем самым повышаются уровень химеризма и эффективность передачи генотипа ЭСК потомкам.

Другой способ получения мышей с модификациями генома – пронуклеарная инъекция. Самая первая трансгенная мышь получена путем микроинъекции экзогенной ДНК (Gordon et al., 1980). Среди родившихся 78 мышей было получено две трансгенные мыши. Одним из главных недостатков данной технологии является случайная встройка трансгена в геном (Smithies et al., 1985). В 1989 г. выполнена работа, целью которой было получение мыши с направленной модификацией в геноме путем инъекции ДНК в пронуклеус (Brinster et al., 1989). В результате было инъецировано 10602 зиготы, родилось мышей 1841, среди

них 506 несли случайную встройку трансгена и лишь одна имела нужную целевую модификацию в локусе МНС II, что показывает несостоятельность данного метода без применения современных технологий для редактирования геномов.

Долгое время единственным эффективным способом получения мышей с целевыми модификациями генома были инъекция ЭСК в полость бластоцист и получение химерных мышей. Данная ситуация изменилась после открытия нуклеаз для направленного редактирования геномов. Так, в 2010 г. показана возможность получения нокаутных мышей с высокой эффективностью (20–75 %) путем инъекции матричной РНК (мРНК) нуклеазы на основе цинковых пальцев (ZFNs) в зиготы мыши (Carbery et al., 2010). В 2013 г. получены нокаутные мыши с применением технологии TALEN при помощи инъекции мРНК TALEN в цитоплазму зигот (Sung et al., 2013).

Наибольшим успехом в генной инженерии сегодня является открытие системы CRISPR/Cas9, при помощи которой в 2013 г. осуществлено редактирование генома млекопитающих с высокой эффективностью (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). В 2014 г. данная технология была применена для получения нокаутных мышей при помощи микроинъекции в зиготу (Yang et al., 2014). С использованием механизмов гомологичной рекомбинации показана высокая эффективность целевых вставок в геном мыши на одноклеточной стадии (Chu et al., 2016; Raveux et al., 2017). В исследовании (Bogoviyak et al., 2016), посвященном хромосомной инженерии, при помощи технологии CRISPR/Cas9 путем микроинъекции в зиготу осуществлены крупномасштабные делеции у мышей. В серии экспериментов удалось получить делеции в гене тирозиназы размером 9.5; 65; 155; 545 и 1.150 т. п. о. Показана высокая частота получения животных с делецией, например при создании делеции 1.150 т. п. о. она достигала 30 %.

Эффективность применения данной технологии напрямую через зиготы не исключает получение мышей через технологию химер. Показана возможность получения ЭСК мыши с большими делециями при помощи CRISPR/Cas9. Для этого был разработан (Kraft et al., 2015) 10-недельный протокол для получения животного с делецией, который назван CRISVar (CRISPR/Cas-induced structural variants). Интересным в этой работе является то, что авторы показали возможность получения не только больших делеций (до 1.6 Mb), но и дупликаций/инверсий целевого участка.

Протокол трансгенеза

Материалы

- CO₂-инкубатор Shel Lab, Model NO: 2123-2 или аналогичный.
- Инвертированный микроскоп (Olympus IX71) с интерференционной оптикой Номарского или аналогичный.
- Гидравлические манипуляторы Narishige или аналогичные.
- Микроинъекционный шприц Narishige (масляный) или аналогичный.
- Компрессор Transjector 5246, Eppendorf или аналогичный.

- Стереомикроскоп Olympus SZX10 или аналогичный.
- Стереомикроскоп Olympus SZ или аналогичный.
- Наркозный аппарат на основе испарителя изофлурана TEC3.
- Пуллер (P-1000, Sutter Instrument Co.) или аналогичный.
- Стекланные капилляры (Harvard Apparatus, GC100-15).
- Пьезодрель PiezoDrill Burleigh или аналогичная.
- Центрифуга Centrifuge 5810 R, Eppendorf или аналогичная.
- Определитель эструса у мышей – Mouse Estrus Detector (MEDpro 100, ELM, Латвия).
- Держатель (холдер) Eppendorf VacuTip (Catalog Number 930001015).
- Игла для инъекции клеток TransferTip (ES) (Catalog Number 930001040).
- Среда для культивирования M2 (Sigma, M7167).
- Среда для культивирования M16 (Sigma, M7292).
- Минеральное масло (Sigma, M8410).
- Гиалуронидаза (H4272, Sigma-Aldrich).
- PMSG (Фоллигон (Folligon), Интервет Интернешнл Б.В., Нидерланды), ветеринарный препарат.
- hCG (Хорулон (Chorulon), Интервет Интернешнл Б.В., Нидерланды), ветеринарный препарат.
- Гибридные мыши первого поколения C57BL/6 × CBA (B6CBAF1) или C57BL/6 × DBA/2 (B6D2F1), самки, возраст два месяца.
- Мыши линии C57BL/6, самцы.
- Мыши линии CD-1, самцы и самки.

Сборка наркозного аппарата на основе испарителя изофлурана TEC3

Испаритель TEC3 имеет камеру, в которой происходит испарение изофлурана, и в зависимости от потока воздуха, который проходит через аппарат, можно регулировать концентрацию анестетика в выходящем воздухе.

Для сборки наркозного аппарата, помимо самого испарителя, необходимы воздушный компрессор, ротаметр (с возможностью регулировать воздушный поток от 0 до 1000 мл/мин), силиконовые трубки, прозрачная пластиковая индукционная камера и маска для наркоза. В качестве компрессора можно использовать аквариумный компрессор с равномерной подачей воздуха и производительностью 400 л/мин или более (например, компрессор Tetra APS 400). Вместо компрессора можно использовать баллон со сжатым воздухом. Для индукционной камеры хорошо подходит пластиковый пищевой контейнер, а для маски – одноразовый шприц объемом 20–25 мл.

Последовательность подключения. К выходному отверстию воздушного компрессора присоединить входной разъем ротаметра через силиконовый шланг, далее к выходному отверстию ротаметра подключить входное отверстие испарителя через силиконовый шланг. К выходному отверстию испарителя присоединить силиконовый шланг, через который будет поступать смесь воздуха с изофлураном к животному.

Для изготовления индукционной камеры в пищевом контейнере просверлить отверстие для подключения шланга. Для изготовления наркозной маски из шприца удалить поршень и использовать только цилиндр корпуса. Шприц имеет удобный наконечник, подходящий для

присоединения шланга; для удобства операции шприц можно прикрепить на тонкую пластиковую пластинку для изменения положения мыши во время операции.

ВАЖНО! Для соблюдения правил безопасности персонала наркозный аппарат устанавливать в помещении с хорошей активной вентиляцией или в вытяжном шкафу.

Наркоз

Операция проводится с использованием ингаляционного изофлуранового наркоза. Мышь помещается в индукционную камеру (параметры наркоза: поток воздуха от 200 до 1000 мл/мин, концентрация изофлурана 5 об.%, %). После того как мышь заснула, переключить шланг к наркозной маске и выставить новые параметры наркоза (200 мл поток воздуха и концентрация изофлурана 1.5–2.5 об.%, %). Во время операции важно следить за дыханием мыши и регулировать концентрацию изофлурана. Как только мышь заснет, проверить при помощи пинцета наличие/отсутствие болевых рефлексов на задних конечностях. При их отсутствии начать операцию. Преимущества данного наркоза – хороший вход и выход животного из состояния наркоза, легкое управление его глубиной, безопасность препарата и низкое влияние на витальные функции.

Подготовка вазектомированных самцов

За две недели до начала эксперимента необходимо подготовить 20 вазектомированных самцов линии CD-1 (можно использовать самцов других линий).

Вазектомия. Наркотизировать мышь. Положение мыши: на спине. Обработать операционное поле 70 % раствором этилового спирта. Выполнить поперечный разрез кожи в нижней части живота, выше препуциальных желез. Салфеткой, смоченной спиртом, удалить волосы из операционного поля, оставшиеся после разреза.

ВАЖНО! Не повредить препуциальные железы во время операции.

Далее выполнить поперечный разрез мышечной стенки. Переместить семенники в брюшную полость надавливанием на мошонку. В операционном разрезе должны появиться жировые капсулы семенников. Вытащить один из семенников за жировую капсулу из операционной раны, закрепить небольшим зажимом, найти и выделить семявыводящий проток. Пережечь или перевязать проток в двух местах (выше и ниже выхода протока). При перевязывании необходимо удалить участок между узлов. Лучше использовать метод пережигания, так как он быстрее и удобнее, чем перевязывание, а также менее травматичен. Для пережигания семенного канатика можно использовать раскаленные на спиртовке бранши пинцета или паяльник с небольшим жалом.

Погрузить семенник с жировой капсулой обратно в брюшную полость, выполнить вазектомию на втором семеннике. Послойно ушить рану, сначала мышечную стенку – кетгутom один-два шва, затем кожу – капроном один-два шва. **ВАЖНО!** При ушивании брюшной стенки не повредить препуциальные железы. Извлечь мышь из наркозной маски и перенести в клетку.

Рассадить вазектомированных самцов по индивидуальным клеткам, посадить по одной-две самки для тестирования.

Суперовуляция

Препараты для суперовуляции

- «Фоллигон» 1000 МЕ/5мл, соответствует PMSG.
- «Хорулон» 1500 МЕ/5мл, соответствует hCG.

Разведение препаратов

- Развести «Фоллигон»: один флакон в 5 мл стандартного растворителя. Полученные 5 мл раствора довести до 20 мл физиологическим раствором. Конечная концентрация препарата 0.05 МЕ/мл.
- Развести «Хорулон»: один флакон в 5 мл растворителя. Полученные 5 мл раствора довести до 30 мл физиологическим раствором. Конечная концентрация препарата 0.05 МЕ/мл.
- Препараты расфасовать, хранить при температуре от -70 до -80 °С. Непосредственно перед применением препараты разморозить и держать на льду до инъекции. Повторно замораживать нельзя.

Схема суперовуляции

- В первый день в 16:00 – 7.5 МЕ (150 мкл) PMS на мышь.
- На третий день в 13:00 – 7.5 МЕ (150 мкл) hCG на мышь.
- Вечером, с 17:00 до 18:00, самок подсадить к фертильным самцам.

ВАЖНО! Подсаживать самок по одной в клетки к самцам, а не наоборот. Не рекомендуется менять подстилку у самца в день или за день до подсадки самки.

- Утром, с 9:00 до 10:00, проверить самок на наличие вагинальных пробок. Отмечать активных самцов, выбраковывая неактивных, создавая тем самым группу самцов с высоким репродуктивным потенциалом.

Подготовка суррогатных матерей

За день до дня трансплантации эмбрионов необходимо подсадить по две-три самки линии CD-1 в клетки к вазектомизированным самцам. Утром, с 9:00 до 10:00, проверить всех самок на наличие вагинальных пробок, особей с пробками отсадить в отдельную клетку. Для увеличения эффективности эмбриотрансфера рекомендуется определять у самок CD-1 эструс прибором Mouse Estrus Detector (Латвия).

Инъекция зигот в цитоплазму или пронуклеус

Получение зигот. 6–10 суперовулированных самок (B6CBAF1 или B6D2F1) подсадить по одной в клетки к самцам линии C57BL/6 на ночь (см. описание суперовуляции). Отобрать особей с вагинальной пробкой. Забить мышей дислокацией шейных позвонков. Извлечь яйцеводы и поместить в каплю 100–200 мкл среды M2. Под стереомикроскопом в капле, придерживая яйцевод ювелирным пинцетом, разорвать ампулу при помощи инсулиновой иглы. Из разрыва в каплю со средой должны выпасть зиготы, окруженные кумулюсными клетками. После того как зиготы извлечены в каплю, добавить гиалуронидазу (из расчета конечной концентрации гиалуронидазы в капле 300 мкг/мл). Контролировать лизирование кумулюсных клеток под микроскопом. Затем зиготы отмыть последовательно через две-три капли со свежей средой M2. После промывки перенести зиготы в капли с M16 под маслом и поместить в CO₂-инкубатор до момента инъекции.

Подготовка игл для микроинъекции. Для изготовления игл используются стеклянные капилляры (Harvard

Apparatus, GC100-15), которые оттягиваются на пуллере (P-1000, Sutter Instrument) при следующих параметрах: Heat 530, Pull 180, Vel. 60, Time 155, Pressure 200, Ramp 508. Полученные иглы загибать до нужного угла (35°) на Micro Forge. Готовые иглы можно хранить в герметичной коробочке из пластика не более одной недели.

Подготовка инъекционного раствора. Перед началом инъекции инъекционный раствор отфильтровать (микрофильтр 0.22 Мкм), отцентрифугировать и расфасовать по 10–20 мкл (пробирки для растворов промывать водой для удаления микропылинок пластика). Непосредственно перед заполнением инъекционной иглы пробирку с раствором центрифугировать при 2 °С и максимальных оборотах в течение 10–15 мин. Затем раствор хранить на льду.

Инъекция. Инъекцию начинать в 13:00, оптимальное время для развития пронуклеусов зиготы. В специальную камеру с дном из предметного стекла поместить каплю 100 мкл среды M2. Покрыть сверху минеральным маслом, тестированным для работы с эмбрионами (Sigma, M8410). Заполнить капилляр для инъекций через тонкий носик (Microloader, Eppendorf) 2–3 мкл инъекционного раствора.

Расположить камеру под микроскоп, установить холдер и инъекционную иглу в фокус, в масле отломить кончик иглы и выпустить пузырьки воздуха до появления раствора при помощи максимального давления компрессора (Transjector 5246, Eppendorf). Переместить холдер и иглу в каплю со средой.

Поместить эмбрионы в нижний полюс капли, холдером присосать зиготу, переместиться в центр. Оптимальное инъекционное давление в иголке 30–50 Па.

Для инъекции в пронуклеус повернуть зиготу так, чтобы пронуклеусы были удобны для прокола. Иголлка и пронуклеус (мужской пронуклеус лучше подходит для инъекции из-за большего размера) должны находиться в одной плоскости. Признаком попадания в пронуклеус служит небольшое его увеличение. Если мембрана пронуклеуса не проткнута, то иглолка окружена мембраной и наблюдаются сферообразные перемещения от конца иглолки к ее началу. В таком случае можно проткнуть пронуклеус насквозь и вернуть иглолку обратно в его полость. После увеличения пронуклеуса вытащить иглолку, переместить инъецированную зиготу в верхний полюс и повторить процедуру с новой зиготой. Непригодные эмбрионы (неоплодотворенные, фрагментированные или зиготы с тремя пронуклеусами) переместить в отдельную группу.

При инъекции в цитоплазму соблюдать те же принципы, что и при инъекции в пронуклеус. Характерным признаком успешной инъекции является локальное разряжение цитоплазмы в области конца иглолки. При неудачной инъекции иглолка окружена мембраной и происходят сферообразные перемещения от конца иглолки. В такой ситуации необходимо проткнуть зиготу до противоположной стенки и вернуть иглолку обратно в цитоплазму.

После того как все зиготы инъецированы, переместить их в капли со средой M16 в CO₂-инкубатор и оставить культивироваться примерно на один час. После культивирования сортировать выжившие зиготы от поврежденных.

Трансплантация эмбрионов в воронку яйцевода

Трансплантация. Наркотизировать мышь. Положение мыши: на животе. Обработать операционное поле 70 % раствором этилового спирта, удалить излишки спирта салфеткой. Выполнить поперечный разрез кожи в проекции левого яичника. Салфеткой, смоченной спиртом, удалить волосы, оставшиеся после разреза. Рассечь мышечную стенку, разрез выполнить над жировой капсулой яичника (жировая капсула и яичник хорошо видны через тонкий слой мышц). Пинцетом извлечь за жировик яичник, яйцевод и начальную часть рога матки. Небольшим зажимом за жировую капсулу зафиксировать органокомплекс в направлении позвоночника перпендикулярно. Под капсулой яйцевода (капсула переходит с яичника на яйцевод) найти воронку и ампулу. Капсула яйцевода пронизана кровеносными сосудами.

ВАЖНО! Найти ампулу яйцевода, убедиться в наличии в ней собственных эмбрионов. Ампула является достоверным анатомическим критерием овуляции. Идентифицировать воронку при помощи двух ювелирных пинцетов, аккуратно надорвать капсулу над воронкой между кровеносными сосудами. Придерживая воронку пинцетом, ввести кончик стеклянного капилляра в воронку. Медленно выдуть эмбрионы в яйцевод до первого пузырька.

Аккуратно вернуть яичник в брюшную полость. Рану послойно ушить, мышечную стенку ушить одним-двумя швами кетгута, кожу – одним-двумя швами капрона. Мышей поместить в клетки и следить за пробуждением.

Особенности анатомии яйцевода. Иногда воронка яйцевода закреплена глубоко и не определяется через капсулу. В таком случае нужно изменить ход операции и переместить органокомплекс в сторону левой нижней конечности. В данной ситуации подсадку эмбрионов выполнить не через воронку яйцевода, а через разрез его стенки.

Разрез выполняется следующим образом. Определить положение ампулы яйцевода, выше ампулы (между воронкой и ампулой) на изгибе яйцевода при помощи глазных ножниц рассечь стенки, не допуская полного ее пересечения. Разрез должен быть минимальным и соответствовать диаметру капилляра. Вставить кончик капилляра в разрез таким образом, чтобы эмбрионы перемещались из капилляра в сторону ампулы. Выдуть эмбрионы в яйцевод до первого пузырька. Далее операцию производить, как описано выше.

Инъекция эмбриональных стволовых клеток в полость бластоцисты

Подготовка ЭСК мыши. Клетки необходимо вырастить заранее, из расчета клетки из одной лунки шестилунчатого планшета на день инъекции. Клетки снять трипсином, центрифугировать, ресуспендировать в 1 мл среды и поставить на лед, используя стандартные методы и принципы культуральной работы.

ВАЖНО! В данном протоколе описывается инъекция в бластоцисты мышей, имеющих черный окрас шерсти. Поэтому для оценки химеризма и передачи генотипа ЭСК потомству ЭСК должны быть получены от мышей отличной окраски (например, от линии мышей 129S1).

Получение бластоцист. Выполнить суперовуляцию 6–10 самкам (B6D2F1), подсадить самок по одной к фер-

тильным самцам линии C57Bl/6 (см. описание суперовуляции). Бластоцисты получают на 3.5 день после коитуса. Мышей забить дислокацией шейных позвонков, извлечь матку и начальный отдел вагинальной трубки, удалить яйцеводы. Вымыть эмбрионы при помощи шприца со сточенной инсулиновой иглой раствором среды M2 под стереомикроскопом из рогов матки. Собрать эмбрионы (бластоцисты и морулы), перенести в капли среды M16 и культивировать в CO₂-инкубаторе до момента инъекции. Морулы оставить в отдельной капле, за время культивирования часть из них созреет до бластоцист.

Инъекция клеток. Инъекция ЭСК производится в специальной камере, дно которой выполнено из стандартного предметного стекла. Камеру заполнить стандартной средой для эмбриональных стволовых клеток (mES growth medium). Установить холдер и иглу для инъекций. Разбавить ЭСК до удобной плотности и при помощи автоматической пипетки поместить их в ванночку (в ее правую или левую сторону).

Для набора клеток в инъекционную иглу использовать масляный шприц Narishige или аналогичный, иглу полностью заполнить маслом. Аккуратно набрать клетки в иглу, заполнив ее до максимально возможного количества (до потери контроля клеток в иглке). Затем перенести несколько бластоцист в камеру. Удобнее выполнять инъекцию при помощи пьезодрели. Использование пьезодрели позволяет избавляться от налипших на иглу клеток, а также легко прокалывать блестящую оболочку и проникать в полость бластоцисты. Вне зависимости от того, используется или не используется пьезодрель, важно попасть в полость бластоцисты и ввести 10–12 клеток.

Ошибкой является введение клеток под блестящую оболочку. Данную процедуру повторить с другими бластоцистами, пока не закончатся клетки в иглке. Инъекцированные бластоцисты поместить в CO₂-инкубатор.

Трансплантация эмбрионов в полость матки

За два-три дня до трансплантации эмбрионов необходимо подсадить по две-три самки линии CD-1 в клетки к вазектомированным самцам. Утром следующего дня, в 9:00, проверить всех самок на наличие вагинальных пробок, самок с пробками отсадить в отдельную клетку. На второй день (на 2.5 день после покрытия) самок можно использовать для трансплантации.

Первые этапы операции аналогичны трансплантации эмбрионов в воронку яйцевода. После извлечения органокомплекса при помощи иглы инсулинового шприца проколоть стенку матки. Затем ввести капилляр в полость матки и переместить эмбрионы. Аккуратно погрузить органокомплекс в брюшную полость и ушить рану.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0002. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Boroviak K., Doe B., Banerjee R., Yang F., Bradley A. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis*. 2016;54(2): 78-85. DOI 10.1002/dvg.22915.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984;309(5965):255-256.
- Brinster R.L., Braun R.E., Lo D., Avarbock M.R., Oram F., Palmer R.D. Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86(18):7087-7091.
- Capecchi M. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244(4910):1288-1292.
- Carbery I.D., Ji D., Harrington A., Brown V., Weinstein E.J., Liaw L., Cui X. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):451-459. DOI 10.1534/genetics.110.117002.
- Chu V.T., Weber T., Graf R., Sommermann T., Petsch K., Sack U., Volchkov P., Rajewsky K., Kühn R. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC Biotechnology*. 2016;16(1):4. DOI 10.1186/s12896-016-0234-4.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823. DOI 10.1126/science.1231143.
- Dupont C., Loos F., Kong-A-San J., Gribnau J. FGF treatment of host embryos injected with ES cells increases rates of chimaerism. *Transgenic Res*. 2017;26(2):237-246. DOI 10.1007/s11248-016-9997-6.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156. DOI 10.1038/292154a0.
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980;77(12):7380-7384.
- Kawase Y., Iwata T., Watanabe M., Kamada N., Ueda O., Suzuki H. Application of the piezo-micromanipulator for injection of embryonic stem cells into mouse blastocysts. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci*. 2001;40(2):31-34.
- Kraft K., Geuer S., Will A.J., Chan W.L., Paliou C., Borschiwer M., Harabula I., Wittler L., Franke M., Ibrahim D.M., Kragesteen B.K., Spielmann M., Mundlos S., Lupiáñez D.G., Andrey G. Deletions, inversions, duplications: engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Rep*. 2015;10(5):833-839. DOI 10.1016/j.celrep.2015.01.016.
- Lin F.L., Sperle K., Sternberg N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985;82(5):1391-1395.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-826. DOI 10.1126/science.1232033.
- Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981;78(12):7634-7638.
- Raveux A., Vandormael-Pourmin S., Cohen-Tannoudji M. Optimization of the production of knock-in alleles by CRISPR/Cas9 microinjection into the mouse zygote. *Sci. Rep*. 2017;7:42661. DOI 10.1038/srep42661.
- Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., Koralewski M.A., Kucherlapati R.S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985;317(6034):230-234.
- Sung Y.H., Baek I.J., Kim D.H., Jeon J., Lee J., Lee K., Jeong D., Kim J.S., Lee H.W. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat. Biotechnol*. 2013;31(1):23-24. DOI 10.1038/nbt.2477.
- Wang Z., Jaenisch R. At most three ES cells contribute to the somatic lineages of chimeric mice and of mice produced by ES-tetraploid complementation. *Dev. Biol*. 2004;275(1):192-201. DOI 10.1016/j.ydbio.2004.06.026.
- Yang H., Wang H., Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat. Protoc*. 2014;9(8):1956-1968. DOI 10.1038/nprot.2014.134.

Сравнительный анализ активности лактаптина, полученного в про- и эукариотических системах экспрессии

О.А. Коваль^{1,2}✉, О.Ю. Волкова³, А.А. Горчаков^{2,3}, С.В. Кулемзин³, А.В. Ткаченко¹, А.А. Нуштаева¹, Е.В. Кулигина¹, В.А. Рихтер¹, А.В. Таранин^{2,3}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Несмотря на множество цитостатических противораковых агентов, имеющихся в арсенале онкологов в настоящее время, все эти препараты обладают значительными побочными эффектами, что может ограничивать их использование для некоторых пациентов. В связи с этим создание новых противораковых препаратов на основе селективных индукторов апоптоза, способных подавлять рост опухоли без повреждения здоровых клеток организма, – актуальная задача молекулярной медицины. Ранее было показано, что белок лактаптин, фрагмент частичного протеолиза каппа-казеина из молока человека, индуцирует гибель раковых клеток в культуре, а его генно-инженерный аналог (RL2), продуцируемый в клетках *E. coli*, вызывает торможение роста солидных опухолей. Так как лактаптин является фрагментом человеческого белка, он не иммуногенен и может применяться многократно без риска индукции специфического иммунного ответа, снижающего эффективность терапии. Мы обнаружили, что рекомбинантный аналог лактаптина в комбинации с циклофосфамидом оказывает аддитивный противоопухолевый эффект. Целью настоящей работы было создание рекомбинантного лактаптина с повышенной цитотоксической активностью за счет его продукции в эукариотических клетках. На основе лентивирусного вектора серии pCDH созданы конструкции pEL1 и pEL2, которые обеспечивают стабильную интеграцию кассет, кодирующих секретрируемые формы лактаптина EL1 и EL2, отличающиеся лидерными последовательностями. Продукция целевых белков подтверждена методом Вестерн-блота; количество продуцируемого белка оценивали методом иммуноферментного анализа. Цитотоксическая активность кондиционированной среды от клеток HEK293T, трансфицированных препаратом плазмиды pEL1, проанализирована в отношении панели опухолевых клеток человека: аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231, рака простаты PC3 и глиобластомы T98G. Обнаружено, что цитотоксическая активность рекомбинантного аналога лактаптина EL1 превышает цитотоксическую активность RL2 более чем в 100 раз. Таким образом, полученные данные позволяют переходить к использованию иммунных клеток в качестве доставщиков лактаптина к раковым клеткам для клеточной терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: лактаптин; проапоптотические белки; противоопухолевая терапия; лентивирусные конструкции.

Comparative analysis of lactaptin activity when produced in bacterial or eukaryotic expression systems

O.A. Koval^{1,2}✉, O.Y. Volkova³, A.A. Gorchakov^{2,3}, S.V. Kulemzin³, A.V. Tkachenko¹, A.A. Nushtaeva¹, E.V. Kuligina¹, V.A. Richter¹, A.V. Taranin^{2,3}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

Despite the multitude of anticancer cytostatic drugs available to oncologists today, most of such drugs have serious side effects that may preclude their use in some groups of patients. Hence, selective induction of apoptosis in cancer but not normal cells remains an attractive goal of molecular medicine. Lactaptin, a proteolytic fragment of the human milk kappa-casein, has been previously identified as a protein displaying potent killing of cancer cells *in vitro*. Its recombinant analog (RL2) produced in *E. coli* has been shown to delay solid tumor growth *in vivo*. Given that lactaptin is of human origin and is not immunogenic, it can be administered to patients multiple times without running the risk of immune response that could dampen the therapy efficacy. In the present study, we demonstrate that the combination of RL2 and cyclophosphamide treatments has an additive therapeutic effect against hepatoma tumor in immunocompetent mice. We asked whether production of lactaptin in human rather than bacterial cells would result in a protein with increased cytotoxic activity. Using lentiviral vector pCDH as a backbone, two constructs, pEL1 and pEL2, encoding secreted forms of lactaptin that differ in their signal sequences were created. Lactaptin expression in human cell lines was confirmed using Western-blot analysis, whereas ELISA was used for quantification of secreted lactaptin. Next, we measured the cytotoxic effects of the media conditioned by pEL1-transfected HEK293T cells, as assayed against the panel of three human cancer cell lines: MDA-MB-231 (adenocarcinoma), PC3 (prostate cancer), and T98G (glioblastoma). We show that EL1-derived lactaptin is at least 100-fold

Received 18.10.2017

Accepted for publication 09.11.2017

© AUTHORS, 2017

O.A. Koval and O.Y. Volkova equal contribution to manuscript preparation.

✉ e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

more cytotoxic than RL2. Taken together, our results provide an opportunity for developing armored immune cells as an “off-the-shelf” platform for targeted delivery of lactaptin to cancer cells.

Key words: lactaptin; proapoptotic proteins; antitumor therapy; lentiviral expression constructs.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Коваль О.А., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., Ткаченко А.В., Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Сравнительный анализ активности лактаптина, полученного в про- и эукариотических системах экспрессии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):764-769. DOI 10.18699/VJ17.292

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Koval O.A., Volkova O.Y., Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Tkachenko A.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Richter V.A., Taranin A.V. Comparative analysis of lactaptin activity when produced in bacterial or eukaryotic expression systems. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):764-769. DOI 10.18699/VJ17.292 (in Russian)

Многие цитостатические средства, используемые в терапии онкологических заболеваний, обладают очень широким диапазоном разрушающего действия, причем не только в отношении целевой опухоли, но и против здоровых тканей. Одним из возможных дополнений к высокотоксичным химиотерапевтическим препаратам, позволяющим снизить их эффективную дозу и, соответственно, общую токсичность без потери противоопухолевого эффекта, может быть использование апоптоз-индуцирующих белковых препаратов. Возможность индукции апоптоза раковых клеток белковыми факторами, специфичными к клеткам опухоли, положена в основу создания ряда современных противораковых фармакологических средств. Например, препараты на основе фактора некроза опухолей (TNF-α) и его лигандов – FasL и TNF-зависимого апоптоз-индуцирующего лиганда (TRAIL) – уже применяли в клинических исследованиях для терапии злокачественных опухолей человека (Nagane et al., 2001; Merino et al., 2007). На основе природного белка лактаптина, выделенного из молока человека и обладающего цитотоксической активностью в отношении ряда опухолевых клеток человека, сконструирован его рекомбинантный аналог RL2 для продукции в клетках *Escherichia coli*. При исследовании механизма цитотоксического действия RL2 показано, что гибель клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231, индуцируемая действием RL2, проходит по механизму апоптоза (Semenov et al., 2010). Исследование активности рекомбинантного лактаптина RL2 *in vivo* также свидетельствовало о его противоопухолевой активности в отношении опухолей мыши и человека (Koval et al., 2012, 2014). Тем не менее при системном введении RL2 животным трудно достичь его высокой концентрации в опухоли, поскольку время его полувыведения из кровотока составляет 0.26 ч (Бондаренко и др., 2015). Этот факт, безусловно, ограничивает возможности применения RL2 и требует развития подходов, позволяющих увеличить как его время полужизни, так и локальную концентрацию в опухоли. Возможным решением этой задачи может быть создание генно-инженерных конструкций, обеспечивающих продукцию лактаптина в эукариотических клетках, резистентных к его проапоптотическому действию. В перспективе такие конструкции можно будет использовать в иммунотерапии рака для «армирования» иммунных клеток человека с целью усиления их цитотоксической активности (Kakarla, Gottschalk, 2014; Song et al., 2016).

Противоопухолевые агенты на основе таких клеток сочетают в себе оптимизированное биораспределение и высокую цитотоксическую активность, что позволяет считать их достаточно универсальными для широких групп онкологических больных (Кулемзин, 2017а).

В настоящей работе созданы генно-инженерные конструкции, обеспечивающие продукцию рекомбинантного лактаптина в клетках эукариот. Рекомбинантный лактаптин, секретируемый в среду трансфицированными клетками, обладал значительно большей цитотоксической активностью, чем лактаптин, полученный из клеток *E. coli*.

Материалы и методы

Рекомбинантный аналог лактаптина RL2 получен и очищен по методике, описанной ранее (Semenov et al., 2010).

Линии клеток и животные. Эксперименты на мышах проводили согласно рекомендациям по использованию лабораторных животных (ECC Directive 86/609/EEC). Самки мышей A/J (6–8 нед) получены из SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск, Россия). Животных содержали в условиях естественного освещения, они имели свободный доступ к пище и воде.

Клетки MDA-MB-231 и T98G получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия); клетки линий PC3 и HEK293T приобретены в ATCC (США). Клетки гепатомы GA1 мыши любезно предоставлены сотрудником Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН В.И. Калединым.

Трансплантация опухолевых клеток и лечение мышей. Самкам мышей линии A/J интраперитонеально были трансплантированы клетки гепатомы A1 (2×10^6 клеток/мышь). Через 24 ч после трансплантации опухолевых клеток животным раз в два дня интраперитонеально вводили препарат RL2 (20 мг/кг) и/или внутривенно циклофосфамид (30 мг/кг) курсом из пяти инъекций. Экспериментальные и контрольная группы содержали по восемь животных в каждой группе.

Создание конструкций для экспрессии секретируемой формы лактаптина в культуре клеток человека. Последовательность ДНК, кодирующая фьюжн-белок лактаптин-6His (RL2), была заимствована из плазмиды pVGF-FR2-PE/L-Pat. С использованием праймеров lactap_AgeF 5'-gcaccggtatgaaccagaacaaccagca-3' и U30R 5'-atgacgtgtgtgtgttgggt-3' на матрице pVGF-FR2-PE/L-Pat проведена ПЦР; полученный продукт гидролизован по

сайтам *AgeI* и *EcoRI*, фланкирующим ORF RL2. Лигирование данного ДНК-фрагмента (~370 п. н.) с гидролизованной по этим же сайтам ДНК векторов pCDH-EF1a-GaussiaSP-MCS-IRES-copGFP и pCDH-EF1a-mIgk-MCS-IRES-copGFP (Кулемзин, 2017б) позволило получить искомые лентивирусные конструкции pCDH-EF1a-GaussiaSP-lact-6His-IRES-copGFP и pCDH-EF1a-mIgk-lact-6His-IRES-copGFP (далее pEL-1 и pEL-2 соответственно).

Наработка лактаптина в линии клеток человека HEK293T при помощи транзитной трансфекции. Клетки линии HEK293T культивировали в среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с 10 % фетальной сывороткой коров HyClone (GE Healthcare, США), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Клетки пересеивали один раз в два дня или за 16 ч перед проведением трансфекции.

Препарат плазмид pEL-1 и pEL-2 подготовлен с использованием наборов очистки плазмидной ДНК EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки линии HEK293T были трансфицированы препаратами плазмид при помощи кальций-фосфатной трансфекции (Kingston et al., 2003). Для трансфекции 5 млн клеток в чашке диаметром 10 см (производство TPP, #93100, Швеция) использовали 10 мкг ДНК. Через 6 ч после трансфекции среду в чашках заменяли на свежую и инкубировали клетки 48 ч. После этого кондиционированные среды фильтровали через 0.45 мкм PES-фильтры и использовали для дальнейшего анализа.

Детекция аналогов лактаптина в кондиционированных средах методом Вестерн-блота. К аликватам кондиционированной среды добавляли 1/4 часть (по объему) буфера состава 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 400 mM β-меркаптоэтанол, 4 % SDS, 40 % глицерин, бромфеноловый голубой (300 нг/мл), ксилен цианоловый (300 нг/мл), и наносили на полиакриламидный гель (5 % концентрирующий и 15 % разделяющий). В качестве маркера молекулярного веса использовали готовый набор предокрашенных белков с молекулярной массой 10–260 кДа (Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Литва). По окончании электрофореза белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) путем влажного электропереноса при 150 В в течение 1 ч в буфере NuPAGE (Novex Life Technologies, США). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в буфере iBind Solution (Novex Life Technologies, США) на приборе iBind Western (Life Technologies) в течение 18 ч с добавлением антител к RL2, конъюгированных с пероксидазой хрена (клон F14, ООО «Биосан», Россия), разведение 1:1000. После этого мембрану инкубировали с хемилюминесцентным субстратом (Novex®ECL, Invitrogen, США) в течение 1 мин и визуализировали данные на люминесцентном сканере C-Digit (LI-COR, США). Данные обрабатывали с помощью программного пакета Image Studio Ver 4.0 digits (LI-COR, США).

Оценка содержания рекомбинантного лактаптина в кондиционированных средах при помощи двухцентрового иммуноферментного анализа. Специфические моноклональные антитела к лактаптину (100 мкл)

(клон F21, ООО «Биосан», РФ) в карбонат-бикарбонатном буфере (0.015 M Na₂CO₃, 0.035 M NaHCO₃, pH 9.6) иммобилизовали на 96-луночные сорбционные планшеты для иммуноферментного анализа (ИФА) (Costar, США) и инкубировали последовательно 60 мин при 37 °С и далее 18 ч при 4 °С. Содержимое лунок удаляли, планшет дважды промывали промывочным буфером (150 mM NaCl, 25 mM Tris, 0.05 % Tween-20, pH 7.5), добавляли в лунки по 200 мкл блокировочного буфера (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.05 % Tween-20, 0.9 % BSA) и инкубировали 1 ч при 37 °С. Лунки дважды промывали промывочным буфером и наносили в трех повторах образцы кондиционированной среды, разбавленной в 2, 5 и 10 раз. Для построения калибровочной кривой готовили образцы RL2 (30, 60, 90, 120, 300, 600 нг/мл) и помещали по 100 мкл в трех повторах в подготовленные ИФА планшеты. Планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего содержимое лунок удаляли и добавляли в каждую лунку по 100 мкл моноклональных антител к лактаптину F15 (ООО «Биосан», Россия), конъюгированных с пероксидазой хрена, и инкубировали 1 ч при 37 °С. Лунки промывали промывочным буфером, добавляли по 100 мкл субстрата (0.05 M цитратно-фосфатный буфер, 0.1 мг/мл ТМВ, 0.006 % H₂O₂ pH 5.0) и инкубировали 20 мин в темноте при 24 °С. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 M H₂SO₄. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на планшетном спектрофотометре Apollo LB 912 (Berthold Technologies, Германия) при λ = 450 нм, референсная волна λ = 620 нм. По полученным результатам строили калибровочную кривую и по линейному участку определяли содержание лактаптина.

Анализ цитотоксической активности методом МТТ.

Анализ цитотоксической активности образцов кондиционированной среды от клеток HEK293T проводили методом МТТ, как описано ранее (Koval et al., 2012). Опухолевые клетки высаживали в 96-луночные планшеты в количестве 1.5×10^3 клеток/лунку в среду RPMI-1640, содержащую 20 % по объему фетальной сыворотки телят (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с добавлением раствора антибиотиков-антимикотиков состава: 100 ед./мл пенициллина G, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.25 мкг/мл амфотерицина (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), и растили в течение 24 ч при температуре (37.0 ± 1.0) °С в атмосфере (5.0 ± 0.5) % CO₂. К лункам добавляли исследуемые субстанции в объеме 100 мкл и продолжали культивирование в стандартных условиях. Через 48 ч среду из лунок удаляли и добавляли по 200 мкл питательной среды RPMI-1640, содержащей раствор 0.25 мг/мл МТТ ((3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолина бромид) (Sigma-Aldrich, США)) и продолжали инкубацию в течение 4 ч. Среду из лунок удаляли и растворяли оставшиеся кристаллы МТТ-формаза добавлением 150 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, США). Оптическую плотность раствора измеряли при λ = 570 нм.

Результаты и обсуждение

Активность аналога лактаптина RL2 в отношении асцитной формы гепатомы ГА1 мыши. Для сравнительной оценки противоопухолевого курса терапии RL2 была выбрана опухолевая линия гепатома ГА1 мыши. Клетки

опухоли были трансплантированы интраперитонеально на мышей A/J, интраперитонеальное введение RL2 проводили через день, начиная со второго дня после трансплантации опухолевых клеток. Поскольку опухоль GA1 характеризуется чувствительностью к циклофосфамиду, он был выбран в качестве как препарата сравнения, так и компонента для комбинированной терапии (Каледин и др., 2002). Мы обнаружили, что средняя продолжительность жизни животных, получавших инъекции RL2, была достоверно выше, чем у животных контрольной группы, получавших внутривенные инъекции физиологического раствора, и составила 18 и 14 дней соответственно (рис. 1).

Инъекции циклофосфамада значительно увеличивали продолжительность жизни мышей-опухоленосителей (в среднем до 26 дней), а наибольшая продолжительность жизни отмечена в группе животных, получавших комбинированную терапию циклофосфамидом и RL2 (в среднем 31 день). Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что рекомбинантный аналог лактапина RL2, получаемый из прокариотических клеток-продуцентов, наибольшую активность показывает в комбинации со стандартным компонентом химиотерапии, циклофосфамидом.

Конструирование плазмид, экспрессирующих аналог лактапина EL1 и EL2, и трансфекция клеток HEK293T. Для наработки секретируемой формы лактапина в эукариотической системе экспрессии мы использовали лентивирусные векторы, в состав которых входят лидерные последовательности люциферазы *Gaussia princeps* и легкой цепи Igk мыши под контролем сильного промотора гена человека *EF1a* (рис. 2).

Данные лидерные последовательности рутинно используются для поверхностной экспрессии или секреции целевых белков в клетках млекопитающих (Lo et al., 1998; Knappskog et al., 2007), однако *a priori* не было известно, обеспечат ли они эффективную секрецию лактапина из клеток в среду. Структура лентивирусных конструкций предусматривает возможность позитивного отбора трансфицированных или трансдуцированных клеток, благодаря коэкспрессии сцепленного через IRES-элемент флуоресцентного репортера copGFP *Pontellina plumata* (Shagin et al., 2004). Соответствие нуклеотидной последовательности, ожидаемой в pEL-1 и pEL-2, подтверждали секвенированием.

Анализ продукции рекомбинантных аналогов лактапина в клетках HEK293T. Для исследования продукции аналогов лактапина EL1 и EL2 клетками HEK293T, трансфицированными плазмидами pEL-1 и pEL-2, клетки растили до состояния монослоя и отбирали образцы среды. Для контроля проводили трансфекцию клеток HEK293T пустым вектором pCDH-EF1a-MCS-IRES-copGFP (System Biosciences, США). Образцы среды анализировали методом Вестерн-блота с применением моноклональных IgG мыши к лактапину. Мы обнаружили, что в образцах кондиционированной ростовой среды от клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами pEL-1 и pEL-2, моноклональные антитела выявляют единственную полосу, которая соответствует расчетной массе рекомбинантных аналогов лактапина EL1 и EL2 (рис. 3).

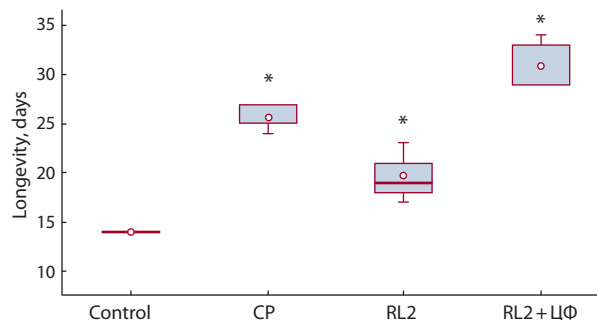


Fig. 1. Mean time to death of A/J mice with intraperitoneally grafted GA1 tumors.

Experimental animals were treated with the RL2 recombinant analog of lactapin and/or cyclophosphamide (CP).

*Difference between the experimental and control groups significant at $p < 0.05$.

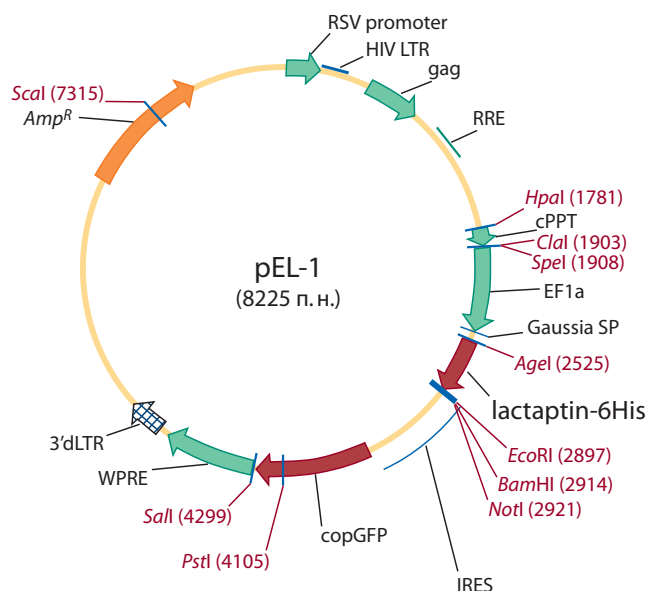


Fig. 2. Lentiviral construct pEL-1 expressing the secreted lactapin form.

EF1a, promoter of the human *EF1a* gene; Gaussia SP, signal peptide of *Gaussia princeps* luciferase; IRES, internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus; copGFP, green fluorescent protein from the copepod *Pontellina plumata*; RSV, hybrid RSV promoter; HIV LTR, long terminal repeat of HIV-1; gag, truncated sequence of the HIV-1 *gag* gene; RRE, HIV-1 REV response element; WPRE, woodchuck virus posttranscriptional regulatory element; 3'dLTR, truncated long terminal repeat of HIV-1; *Amp^R*, ampicillin resistance gene. The structure of the pEL-2 plasmid is nearly the same as pEL-1 except for the region encoding the signal peptide: METDTLLWVLLLVPGSTG (pEL-2, mlgk) vs. MGVKVLFALICIAVAEAKPTG (pEL-1, GaussiaSP).

Таким образом, подтверждена секреция белков EL1 и EL2 клетками HEK293T. Для того чтобы количественно оценить содержание целевых рекомбинантных белков в кондиционированной среде, был проведен двухцентровой иммуоферментный анализ. Образцы с известными концентрациями белка RL2 использовали для построения калибровочной кривой. Мы обнаружили, что концентрация рекомбинантного лактапина в культуральной среде EL1 составляла 510 нг/мл, а EL2 – 420 нг/мл.

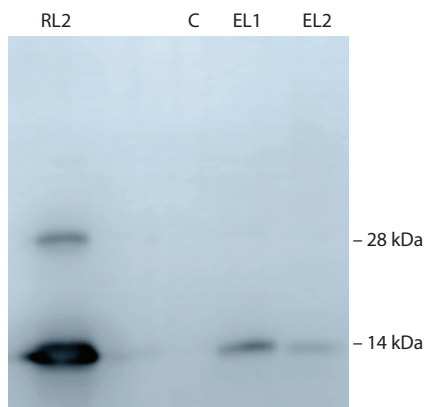


Fig. 3. Western blotting of recombinant lactaptins secreted into the culture medium of HEK293T cells.

RL2, the lactaptin analog used as positive control; C, conditioned medium of HEK293T cells transfected with pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP; EL1 and EL2, conditioned media of cells transfected with pEL-1 and pEL-2, respectively.

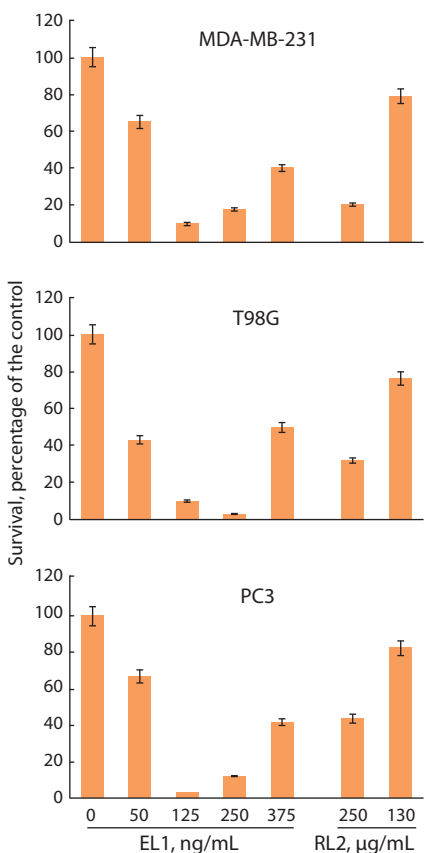


Fig. 4. Viability of human tumor cells treated with conditioned medium containing recombinant lactaptin EL1.

The recombinant lactaptin analog RL2 was used as positive control. Viability was normalized to the percentage of live cells in cultures treated with supernatants from HEK293T cells transfected with empty vector DNA pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP.

Анализ цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей аналог лактаптина EL1. Ранее нами показано, что IC₅₀ RL2 для чувствительных опухолевых клеток в среднем составляет 300 ± 100 мкг/мл (Koval et al., 2014, 2015). Полученные данные по содержанию белков EL1 и EL2 в кондиционированной среде свидетельствуют о том, что концентрация EL1 и EL2 приблизительно в 500 раз ниже значения IC₅₀ RL2. Поэтому для оценки цитотоксической активности был использован аналог EL1, содержание которого в среде выше, чем EL2. Для анализа цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей аналог лактаптина EL1, были выбраны клетки опухолевых линий человека различного гистологического происхождения: аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231, рака простаты PC3 и глиобластомы T98G.

Поскольку к клеткам добавляли кондиционированную среду, а не выделенный белок, количество белка EL1, добавляемого в лунки, было ограничено объемом кондиционированной среды и не превышало 150 мкл. Вследствие этого максимальной исследуемой дозой EL1 была доза 375 нг/мл. Данные, представленные на гистограммах, свидетельствуют о выраженной цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей EL1 (рис. 4). Можно видеть, что сравнимое снижение жизнеспособности исследуемых клеток вызывало добавление среды с нанограммовым количеством белка EL1 и микрограммовое количество белка RL2.

Таким образом, мы показали, что кондиционированная среда от клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pEL1, содержала целевой белок EL1 и оказывала большее цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека, чем аналог лактаптина RL2, продуцируемый клетками *E. coli*. Учитывая продемонстрированную способность аналога лактаптина RL2 оказывать противоопухолевое действие *in vivo* и усиливать действие циклофосфамида, можно предположить, что аналог EL1 будет также проявлять высокую противоопухолевую активность как в монорежиме, так и в комбинации с традиционными химиотерапевтическими препаратами. Кроме того, полученные плазмиды pEL1 и pEL2 могут быть использованы в дальнейшем для получения «усиленных» вариантов различных иммунных клеток человека для иммунотерапии опухолей. Возможно, такие клетки, помимо своей цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток-мишеней, смогут выполнять функцию доставщиков лактаптина в опухоль, обеспечивая его высокую локальную концентрацию и терапевтический эффект.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project 14.604.21.0169 (RFMEFI60417X0169).

DNA sequencing was conducted at the shared access center “Molecular and Cell Biology”, Institute of Molecular and Cell Biology, Novosibirsk.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bondarenko D.A., Richter V.A., Kuligina E.V., Koval O.A., Fomin A.S., Skoblov Y.S., Dyachenko I.A., Kravchenko I.N., Sadovnikova E.A., Semushina S.G., Novikova N.I., Turobov V.I., Murashev A.N. Toxicity studies and pharmacokinetics of Lactaptin. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal* = Journal of Biopharmaceuticals. 2015;7(2):40-47. (in Russian)
- Kakarla S., Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? *Cancer J.* 2014; 20(2):151-155. DOI 10.1097/PPO. 0000000000000032.
- Kaledin V.I., Nikolin V.P., Galyamova M.R., Vasil'eva E.D., Baymak T.Y., Popova N.A. High apoptosis-inducing and antitumor activities of the products of biological but not chemical cyclophosphamide activation. *Doklady RAN* = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. 2002;386(5):705-708. (in Russian)
- Kingston R.E., Chen C.A., Rose J.K. Calcium phosphate transfection. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2003;9. DOI 10.1002/0471142727.mb0901s63.
- Knappskog S., Ravneberg H., Gjerdrum C., Trösse C., Stern B., Pryme I.F. The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent

- on the choice of signal peptide. *J. Biotechnol.* 2007;128(4):705-715. DOI 10.1016/j.jbiotec.2006.11.026.
- Koval O.A., Fomin A.S., Kaledin V.I., Semenov D.V., Potapenko M.O., Kuligina E.V., Nikolin V.P., Nikitenko E.V., Richter V.A. A novel pro-apoptotic effector lactaptin inhibits tumor growth in mice models. *Biochimie.* 2012;94(12):2467-2474. DOI 10.1016/j.biochi.2012.08.017.
- Koval O., Sakaeva G., Fomin A., Nushtaeva A., Semenov D., Kuligina E., Gulyaeva L., Gerasimov A., Richter V. Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumour samples to new potential anticancer peptide lactaptin. *J. Cancer Res. Ther.* 2015;11(2):345-351. DOI 10.4103/0973-1482.157301.
- Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S., Semenov D.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Zavjalov E.L., Richter V.A. Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e93921. DOI 10.1371/journal.pone.0093921.
- Kulemzin S.V., Chikaev N.A., Volkova O.Y., Kuznetsova V.V., Taranin A.V., Gorchakov A.A. Modular lentiviral vector system for chimeric antigen receptor design optimization. *Bioorganicheskaya khimiya = Journal of Bioorganic Chemistry.* 2017b;43(2):124-132. DOI 10.7868/S0132342317020117. (in Russian)
- Kulemzin S.V., Kuznetsova V.V., Mamonkin M., Taranin A.V., Gorchakov A.A. CAR T-cell therapy: Balance of efficacy and safety. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology (Moscow).* 2017a; 51(2):274-287. DOI 10.7868/S0026898417020148. (in Russian)
- Lo K.M., Sudo Y., Chen J., Li Y., Lan Y., Kong S.M., Chen L., An Q., Gillies S.D. High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng.* 1998;11(6):495-500. DOI 10.1093/protein/11.6.495.
- Merino D., Lalaoui N., Morizot A., Solary E., Micheau O. TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2007;11(10):1299-1314. DOI 10.1517/14728222.11.10.1299.
- Nagane M., Huang H.J., Cavenee W.K. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis.* 2001;6(3):191-197. DOI 10.1023/A:1011336726649.
- Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V., Koval O.A., Matveeva V.A., Babkina I.N., Tikunova N.V., Richter V.A. Recombinant analogs of a novel milk pro-apoptotic peptide, lactaptin, and their effect on cultured human cells. *Protein J.* 2010;29(3):174-180. DOI 10.1007/s10930-010-9237-5.
- Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol.* 2004;21(5):841-850. DOI 10.1093/molbev/msh079.
- Song X., Hong S.H., Kwon W.T., Bailey L.M., Basse P., Bartlett D.L., Kwon Y.T., Lee Y.J. Secretory TRAIL-armed natural killer cell-based therapy: in vitro and in vivo colorectal peritoneal carcinomatosis xenograft. *Mol. Cancer Ther.* 2016;15(7):1591-1601. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-15-0937.

Использование геномных данных в селекции птицы

А.Ф. Яковлев , Н.В. Дементьева

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Новые технологии определения последовательности нуклеотидов ДНК позволили открыть сотни тысяч мононуклеотидных полиморфных маркеров, часть из которых ассоциирована с племенными качествами животных. Разработанная на основе этих достижений геномная селекция произвела революционный сдвиг в птицеводстве. Система полиморфных маркеров предоставляет уникальную возможность значительно повышать точность расчетных значений селекции, управлять генетической изменчивостью, сокращать интервалы между генерациями и ускорять генетический прогресс. Геномная селекция в птицеводстве имеет ряд отличий от подобной технологии, используемой на сельскохозяйственных видах млекопитающих. Наличие двух категорий хромосом (микро- и макрохромосомы) с разной скоростью рекомбинаций, включение в геномную оценку женских особей, а также быстрая смена поколений вносят свои особенности. Технология интенсивно внедряется в различные отрасли птицеводства, включая бройлерное производство, и используется основными птицеводческими компаниями. Совершенствованию отдельных этапов геномной селекции поможет улучшение регистрации количественных признаков, математической обработки молекулярной базы данных, импутации и оценки генетического неравновесия по сцеплению.

Ключевые слова: птица; секвенирование; мононуклеотидный полиморфизм; геномная селекция; маркеры; неравновесие по сцеплению; импутация.

Evaluation of the genome in bird breeding

A.F. Yakovlev , N.V. Dement'eva

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics
and Breeding, St. Petersburg, Pushkin, Russia

New technologies determining the DNA sequence of nucleotides have led to the discovery of hundreds of thousands of mononucleotide polymorphic markers, some of which are associated with breeding quality of animals. Developed on the basis of these achievements, genomic selection has produced a revolutionary shift in the poultry industry. The developed molecular marker system provides a unique opportunity to significantly improve the accuracy of estimated breeding values to manage genetic variability, to reduce the interval between generations, and accelerate genetic progress. Genomic breeding in the poultry industry has a number of differences from similar technology used in agricultural mammalian species. The existence of two categories of chromosomes (macro- and micro-chromosomes) with different rates of recombination, the preferred genomic females evaluation, rapid change of generations make their own features. Technology is introduced rapidly in various sectors of the poultry industry, including broiler production, and is used by major poultry companies. The individual steps of genomic selection need to be improved, and the continuous improvement of technology can be attained though its use in practical and scientific. The improvement of the separate stages of genome selection will be helped by perfection of registration and mathematical treatment of the phenotypical and molecular database, imputation and estimations of linkage disequilibrium.

Key words: bird; sequencing; SNP; genomic selection; markers; linkage disequilibrium; imputation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Яковлев А.Ф., Дементьева Н.В. Использование геномных данных в селекции птицы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7): 770-777. DOI 10.18699/VJ17.298

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yakovlev A.F., Dement'eva N.V. Evaluation of the genome in bird breeding. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):770-777. DOI 10.18699/VJ17.298 (in Russian)

Геномная селекция (genomic selection – GS) произвела революционный сдвиг в племенной работе. Открытие сотен тысяч мононуклеотидных маркеров – SNP (single nucleotide polymorphism), охватывающих весь геном и связанных с количественными признаками, предоставило уникальную возможность значительно повысить точность оценки результатов селекции. Управление генетической изменчивостью позволило сократить интервал между генерациями и ускорить генетический прогресс (Smaragdov, 2009; Яковлев, Смарагдов, 2011). Технология интенсивно внедряется в различные отрасли птицеводства, включая бройлерное производство, и используется основными птицеводческими компаниями: Aviagen, Cobb, Hy-Line International, ISA и др.

Породы кур отличаются широким разнообразием по размеру и массе тела, скорости роста, показателям воспроизводства, экстерьеру, окраске и структуре оперения, форме гребня, особенностями поведения и т. д. Исследование генетических маркеров в популяциях птиц дало обширные знания о генетике признаков. Технология геномной селекции включает этапы регистрации фенотипических данных (например, для яичных пород кур – около 16 признаков), выявление ассоциации SNP с фенотипическими признаками (genome wide association study – GWAS), анализ данных о регистрируемых признаках референтной популяции (the training data) и вычисление индекса племенной ценности (Wolc et al., 2011). Оптимальное число поколений в референтной популяции, которое позволяет достигать наибольшей точности прогнозирования (genomic estimated breeding values – GEBV), определяется отдельно для каждого признака. Оптимальное число поколений может быть 2–4 или более в зависимости от уровня наследуемости признаков (Weng et al., 2016). На практике оптимальное число поколений, которые будут использоваться в референтной популяции с множественными признаками отбора, зависит от важности признаков в программе разведения.

Прогностическая эффективность геномных оценок GEBV складывается из значений ассоциаций между SNP-маркерами и фенотипическими данными с учетом генетического неравновесия по сцеплению – LD (linkage disequilibrium) и степени родственных связей птиц. Генетический и экономический прогресс достигается за счет повышения уровня регистрируемых показателей в увеличивающейся численности поголовья каждой генерации. Точность вычисления племенной ценности зависит в основном от определяемой плотности SNP-маркеров при помощи используемых чипов, коэффициента наследуемости признака и численности референтной популяции (Solberg et al., 2009).

За последнее десятилетие интерес к выявлению генов или геномных областей, которые являются объектом селекции, растет. Определение SNP-маркеров позволяет получить ценную информацию о генах или геномных областях, которые находились под давлением отбора. Оценка генома становится практикой в совершенствовании птиц. Несмотря на высокую пропускную способность генотипирования, использование этой технологии в широких масштабах ограничивается ее высокой стоимостью. Однако методология геномной селекции совершенствуется и имеются реальные надежды на снижение затрат.

Регистрация фенотипической и молекулярной эволюции

Для более полного понимания генетических механизмов важно идентифицировать геномные регионы, приводящие к фенотипической дифференциации в процессе селекции птиц. Общедоступными чипами для кур являются чипы средней плотности (SNP60K) или более низкой плотности (Groenen et al., 2011) производства Illumina (США) и чип высокой плотности типа SNP600K (Kranis et al., 2013) производства Affymetrix (США). С использованием чипа SNP60K были просканированы геномы двух линий кур, у которых в процессе 50 поколений отбора получена 9-кратная разница по массе тела (Johansson et al., 2010). Анализ свыше 50000 SNP показал, что в результате селекции в линиях фиксированы альтернативные аллели в более чем 50 регионах генома. Обнаружено также 10 регионов фиксации дифференциации 3-го, 5-го и 10-го поколений. Многие регионы по всему геному показали значительные различия в частоте аллелей между линиями, например, на хромосоме 1 найден регион, связанный с размером грудной мышцы, на хромосоме 3 – с ростом и жировым обменом, на хромосоме 4, в разных районах, – со скоростью роста и живой массой. Это указывает на эволюцию фенотипических признаков в линиях в процессе 50 поколений в результате эксплуатации устоявшейся генетической изменчивости. Различия по частоте аллелей свидетельствуют об интенсивности селекции. К сожалению, результаты анализов пока не обеспечивают доказательств участия конкретных генетических полиморфизмов в фенотипической экспрессии, т. е. имеется мало объяснений проникновений в суть потенциальных генетических механизмов, действующих либо на уровне единичных генов, либо через взаимодействие конкретных генных сетей. Ясно, что эволюция является тем процессом, с помощью которого популяции генетически адаптировались в ответ на селекцию. Поэтому понимание генетических механизмов, приводящих к фенотипической дифференциации, требует идентификации областей в геноме, которые находились под давлением отбора.

При помощи SNP60K-чипов проведено сравнение влияния GS и традиционной селекции согласно методологии BLUP (Best Linear Unbiased Prediction – наилучший линейный несмещенный прогноз) в трех различных яичных линиях кур (Heidaritabar et al., 2014). Средние изменения частоты аллелей были больше с GS (0.056, 0.064 и 0.066) по сравнению с BLUP (0.044, 0.045 и 0.036) для линий B1, B2 и W1 соответственно. В трех линиях, на которых использовался BLUP, было выделено 35 регионов, находящихся под селекционным давлением, тогда как при использовании GS было выявлено 70 подобных регионов. Оценено изменение частот аллелей по всему геному в популяциях, которые прошли селекцию в течение двух поколений на основе разных методов – племенной BLUP EBV и геномной EBV (GEBV). Пороги изменения частот аллелей значительно различались при GS (0.167–0.198) и BLUP (0.105–0.126). Эти результаты показывают, что в равных условиях при GS степень давления отбора гораздо выше, чем при использовании BLUP.

Благодаря использованию молекулярно-генетических инструментов, в формировании количественных призна-

ков появилось больше ясности, и, следовательно, молекулярные маркеры помогут предсказать генетическую ценность птицы более точно (Dekkers, 2004) и увеличить генетический прогресс. После разработки сравнительно недорогих и надежных методик генотипирования, особенно нового поколения (Pérille et al., 2016), такой подход стал возможен в практической селекции (Wang et al., 2009).

Направленный отбор оказывает влияние на гетерозиготность популяции. Большинство методов геномного анализа, разработанных для оценки аллельного разнообразия, основаны на расчете частот определенных аллелей (Elferink et al., 2012), а также на неравновесии по сцеплению (Ennis, 2007). Уже ранние исследования показали, что частоты желательных аллелей, а также аллели в соседних регионах возрастают с течением времени, когда популяция подвергается отбору (Smith, Haigh, 1974). Этот процесс может увеличить возможность достоверного выявления связи SNP-маркера с количественным признаком. Обнаружение таких связей в нескольких поколениях и в референтной популяции дает возможность вычислять прогноз относительно племенной ценности родителей и будущих потомков.

Геномные исследования полезны для изучения закономерностей изменения ДНК в свете генетической основы формирования фенотипических признаков. К настоящему времени имеется много сообщений об ассоциации между генотипами и фенотипами у кур. Наблюдалась связь некоторых SNP разных пород с такими признаками, как вес тела (Sharma et al., 2008; Bai et al., 2012), ранняя и поздняя смертность (Livant et al., 2007), межмышечное отложение жира (Zhang et al., 2012), масса брюшного жира и толщина подкожного жира (Liu et al., 2006), частота заболеваний (Ewald et al., 2011).

Неравновесие по сцеплению определяется как неслучайная ассоциация аллелей двух или более локусов (Qanbari et al., 2010) и является полезным инструментом в области генетики и эволюционной биологии, а также для понимания уровня инбридинга (García-Gómez et al., 2012) и генетических характеристик популяций животных (Porto-Neto et al., 2014). Завершение первого проекта куриного генома сделало возможным развитие и использование SNP-маркеров высокой плотности (Kranis et al., 2013). Появление чипов с высокой плотностью SNP-маркеров облегчило оценку LD (Hillier et al., 2004). Относительно небольшая стоимость чипов низкой плотности привела к широкому использованию их в исследованиях. Так, чип Illumina SNP60K BeadChip для кур состоит из панели 57636 SNP (Groenen et al., 2011), которые нашли применение в анализе различных коммерческих (Qanbari et al., 2010) и генофондных популяций кур (Wragg et al., 2012). Оценка LD полезна в анализе малочисленных популяций кур для определения эволюционной истории и расчета генетических параметров популяций, особенно при отсутствии племенных записей (Andreescu et al., 2007; Lu et al., 2012). Точная характеристика неравновесия по сцеплению внутри и между популяциями играет важную роль в генетических исследованиях домашних птиц, так как лежит в основе всех форм картирования генов и является важным параметром при проектировании маркерных панелей. В исследовании (Aerts et al., 2007) показаны су-

щественные различия в степени LD между популяциями, причем у яичных пород имеет место более высокая степень LD по сравнению с мясными бройлерами (Heifetz et al., 2005; Andreescu et al., 2007). Различия в разнообразии между макро- и микрохромосомами по числу гаплотипов и частоте обменов гаплотипов были объяснены вкладом неодинаковой скорости рекомбинации в эти двух группах хромосом (Megens et al., 2009).

Оценка обмена гаплотипами между популяциями представляет интерес, поскольку может помочь в прогнозировании селекции (de Roos et al., 2008). Анализ обширных карт гаплотипов различных популяций (International HapMap Consortium, 2005, 2007) подтвердил организацию гаплотипов в гапоблоки. Выяснение структуры гапоблоков оказалось полезным для проектирования анализов результатов генотипирования SNP, которые фиксируют максимальное количество разнообразия гаплотипов (Gabriel et al., 2002). Конструкция карты гаплотипов генома для курицы важна для разработки анализа генотипирования в условиях высокой плотности SNP.

Результаты ассоциации SNP и признака в большой степени зависят как от наличия причинных, т. е. влияющих на фенотип, мутаций (SNP), так и от случайных сцеплений. Низкий уровень LD может быть аргументом для использования чипов с более высокой разрешающей способностью (Zhao et al., 2007). Прогресс в области секвенирования нового поколения и использование чипов с высокой плотностью генотипирования открывают более широкие возможности для выявления полиморфизмов и достижения точного прогнозирования в геномной селекции. Другим из подходов в изучении геномных ассоциаций является использование гибридной птицы межлинейного кросса вместо чистых линий (Fu et al., 2015). Он повышает эффективность поиска достоверных ассоциаций SNP с количественными признаками, что положительно сказывается на точности геномных оценок селекции и прогноза результатов скрещивания, даже с использованием чипа 60K. Поиск причинных полиморфизмов, так же как и надежный прогноз общей генетической ценности кандидатов для отбора, является одной из основных целей геномной селекции. Несмотря на различные цели, успех этих двух подходов зависит прежде всего от уровня неравновесия по сцеплению между маркерами и выявления причинных полиморфизмов (Zhao et al., 2007).

Макро- и микрохромосомы в геномной оценке

Известно, что у большинства видов птиц геном представлен макро- и микрохромосомами. У курицы пять первых макрохромосом (GGA 1–5) варьируют в размерах от 50 до 200 Mb, пять промежуточных хромосом (GGA 6–10) – в диапазоне от 20 до 40 Mb, в 28 микрохромосомах (GGA 11–38) объем в среднем составляет ~12 Mb и в самых маленьких – ~5 Mb и менее (Rao et al., 2011). В микрохромосомах имеется более высокое содержание GC-пар. Межгенные расстояния (включая размер интронов) на микрохромосомах меньше, что приводит к значительно более высокой плотности генов по сравнению с макрохромосомами. Расстояние между точками рекомбинации в микрохромосомах 50–100 kb/cM, что значительно меньше

по сравнению с макрохромосомами (~300 kb/cM). Отсюда LD не может быть одинаковым по всему геному.

Точность прогноза в геномной селекции

Исследование вклада генных (кодирующих) и негенных (некодирующих) регионов в обнаружении связей с фенотипическими проявлениями представляет большой интерес для использования в геномной селекции. До недавнего времени изучение геномных ассоциаций было сосредоточено на кодирующих генах, о чем свидетельствует появление секвенирования экзонов с разработкой специальных компьютерных программ (Cosart et al., 2014). Следует отметить, что генотипирование экзонов – менее дорогостоящий процесс, чем секвенирование целого генома.

В исследованиях (Abdollahi-Arpanahi et al., 2016) было проведено генотипирование чипами SNP600K Affymetrix и поиском ассоциации с рядом фенотипических признаков бройлеров. Последующий анализ шести геномных областей (межгенных, интронов, миссенс-районов, синонимичных кодонов, 5'- и 3'-нетранслируемых областей и регионов, которые расположены в 5 kb вверх и вниз от кодирующих генов) показал, что все геномные области имеют важное значение для оценки целевых признаков, а такой подход к изучению целого генома является лучшим инструментом для прогнозирования количественных признаков.

Конечно, класс синонимичных последовательностей, как правило, имеет наибольший вклад. Вне зависимости от изучаемого признака вклад геномной дисперсии доминирования к общей генетической изменчивости был незначительным, как и вклад каждого из геномных регионов к дисперсии доминирования. Тем не менее в общей сложности вклад доминантной дисперсии в общую генетическую изменчивость был гораздо ниже по сравнению с аддитивной дисперсией (Abdollahi-Arpanahi et al., 2016).

Самая низкая прогностическая способность была получена для класса миссенс геномных областей. Как известно, миссенс-мутация приводит к изменению кодона. С другой стороны, класс аннотированных синонимичных областей включает SNP, для которых замена одного основания на другой в кодирующей области не модифицирует аминокислоту. В целом имеющиеся результаты исследований свидетельствуют о том, что варианты некодирующих нуклеотидных последовательностей в геноме также очень важны для прогноза племенной ценности, и внимание не должно быть ограничено вариантами в пределах только белок-кодирующих областей. Вклад в прогноз класса межгенных регионов для признаков бройлеров был подтвержден в ряде работ. К тому же увеличение размера выборки может повысить мощность прогноза степени проявления количественных признаков (Fan et al., 2013; Morota et al., 2014). Таким образом, все генные и негенные регионы вносят свой вклад в фенотипическую вариабельность.

Данные Энциклопедии элементов ДНК (The ENCODE Project, 2012) показывают, что, учитывая многие транскрипционные факторы, метилирование ДНК, модификацию структуры хроматина и гистонов и другие регуляторные механизмы, можно считать, что около 80 % генома имеет биохимические функции. Тем не менее ДНК-последовательности в межгенных участках считаются «темной материей», или «темной материей транскриптов», так как их роль по-прежнему неоднозначна. Проведенные исследования показали, что 43 % регионов в геноме, которые обнаруживаются при GWAS, указывают на межгенную локализацию (за пределами промотора и расшифрованных областей) и 45 % – на интроны (Hindorff et al., 2009). В то же время миссенс-кодона и промоторные области значительно обогащены признак-ассоциированными SNP, тогда как межгенных областей представлено значительно меньше (Kindt et al., 2013). С другой стороны, прогнозирование по анализу целого генома для предсказания генетической ценности индивидов основывается на эффекте всех расчетных вариантов одновременно. Так, выявлено, что генные регионы внесли существенный вклад в аддитивную генетическую изменчивость по сравнению с негенными регионами (Yang et al., 2011), так же как и классы миссенс и синонимичных геномных областей (Koufariotis et al., 2014). Миссенс-регионы неизменно характеризовались самой низкой воспроизводимостью, тогда как синонимичные регионы имели самую высокую воспроизводимость с точки зрения получения корреляций для прогноза (Do et al., 2015). Вероятно, вклад неаддитивной дисперсии к общей вариации незначителен, в то время как взаимодействие внутри и между локусами генома – широко распространенное явление.

Мультилокусные взаимодействия вносят значительный вклад в аддитивную дисперсию и не приводят к значительному увеличению неаддитивной генетической дисперсии, но если уровень гетерозиготности высок при анализе множества локусов, то эпистатические локусы объясняют большую часть неаддитивной дисперсии, хотя эпистатические эффекты могут влиять и на аддитивную дисперсию. Как правило, предполагают, что чем больше количество животных в референтной популяции и чем выше наследуемость отдельного признака, тем выше точность предсказания племенной ценности. Так, определена точность прогнозирования в зависимости от числа поколений предков, включенных в референтную популяцию линий (Weng et al., 2016). При этом были использованы записи 16 фенотипических признаков. Уровень точности прогнозирования племенной ценности увеличивался с увеличением числа тесно связанных поколений предков. Оптимальное число референтных поколений составляло 4 или более для признаков с высоким коэффициентом наследуемости. В среднем точность была выше с моделью BayesB, чем с BLUP (анализ родословных). Анализ данных показал, что точность геномного прогнозирования и BLUP может быть под влиянием наследуемости признака, характера фиксированных эффектов и степени аддитивных генетических взаимоотношений между фенотипом особей и кандидатов для отбора.

Таким образом, геномная точность прогнозирования зависит от плотности маркеров чипа (Meuwissen et al., 2001), числа животных в референтной популяции (Daetwyler et al., 2008; Hayes et al., 2009), размера и числа локусов количественных признаков, их уровня наследования (Daetwyler et al., 2010; Kizilkaya et al., 2010), а также от уровня неравновесия по сцеплению или связи между маркерами и локусами количественных признаков (Habier et al., 2010).

Таким образом, геномная точность прогнозирования зависит от плотности маркеров чипа (Meuwissen et al., 2001), числа животных в референтной популяции (Daetwyler et al., 2008; Hayes et al., 2009), размера и числа локусов количественных признаков, их уровня наследования (Daetwyler et al., 2010; Kizilkaya et al., 2010), а также от уровня неравновесия по сцеплению или связи между маркерами и локусами количественных признаков (Habier et al., 2010).

Включение данных о животных из прошлых поколений способно увеличить объем референтных данных. В отличие от BLUP, геномный GBLUP-прогноз, учитывая высокий LD между маркерами и QTL далеких поколений, вносит свой вклад в точность прогнозирования (Habier et al., 2007). Была проведена оценка влияния прошлых поколений на точность GEBV с использованием пошагового ssGBLUP-метода (Lourenco et al., 2014), где геномная матрица родства была объединена с аддитивной матрицей родства, полученной на основе записей племенного учета. Определяли влияние исключения поколений, которые могли влиять на снижение точности оценки. Удаление данных третьего и четвертого поколений не уменьшало заметно точность оценок.

Оптимизация геномного секвенирования нового поколения (NGS) по прописи Корнеллского университета (CornellGBS), основанная на платформе Illumina (Pérille et al., 2016), с предварительным использованием ферментов рестрикции *PstI* и *SbfI* позволила после фильтрации 134528 SNP выявить 67096 уникальных SNP, о 20.7 % из которых ранее не сообщалось. Такой подход показал высокую производительность, особенно в выявлении SNP в регионах экзонов и в микрохромосомах, с высокой экономической эффективностью. Использование этой методики открывает более широкие возможности для применения генотипирования в птицеводстве.

Проведен анализ данных высокой плотности SNP линии бройлеров для обнаружения низкого разнообразия областей генома, сформированных примерно в течение 70-летней селекции (Stainton et al., 2016). Идентифицировано семь регионов с нулевым разнообразием (гомозиготных районов). Большинство из них были очень малы и не содержали много генов. Кроме того, идентифицированы 15 регионов с возрастанием разнообразия от низкого уровня. Эти участки были крупнее и, как правило, включали несколько генов (в том числе *IGF1*, *GPD2*, *MTNR1A1*). Полученные результаты свидетельствуют о том, что идентификация областей нулевого разнообразия может быть использована для характеристики регионов при отборе. Регионы, показывающие закономерности разнообразия и согласующиеся с селективным всплеском, содержат ряд генов, которые являются функциональными кандидатами для участия в процессе развития бройлеров. При отсутствии других факторов положительный отбор, в конечном счете, может привести к появлению благотворных аллелей, которые закрепляются в популяции. Поэтому регионы с низким уровнем изменчивости могут указывать на действие положительного отбора и характеризовать цели селекции (Sabeti et al., 2002; Kim, Nielsen, 2004). Например, один из регионов на хромосоме 1 содержит ген инсулиноподобного фактора роста 1 (*IGF1*) (Zhou et al., 2005), регион на хромосоме 7 содержит ген 3-фосфат-дегидрогеназы глицерина 2 (*GPD2*), который связан с увеличением производства глицерина и накоплением жира в брюшной полости (Resnyk et al., 2013). Локальное уменьшение генетической изменчивости может быть следствием быстрой фиксации благотворных мутаций. Изучение таких достоверных находок предоставляет ценную информацию о геномных областях, несущих интересные гены, которые находились под селективным давлением. Дифференциация

различных генотипов поможет понять механизмы, которые привели к их фенотипической реализации. Общей стратегией геномной оценки является обнаружение достоверных маркеров для селекции путем сравнения образцов из различных популяций в результате поиска геномных областей с существенными генетическими различиями специфических признаков. Особый интерес представляет обнаружение достоверных значений в популяциях яичных кур с использованием программы hapFLK9 (Fariello et al., 2013), которая позволяет анализировать информацию о неравновесии по сцеплению в иерархической структуре популяций (Gholami et al., 2015). В результате исследования трех яичных пород с определением приблизительно 1 млн SNP обнаружен ряд гаплотипов и генов (в том числе *IGF-1R*, *AGRP* и *STAT5B*, *Sox10*). К тому же использование надежных статистических программ позволило снизить уровень ложных обнаружений.

Получены подтверждения, что скорость рекомбинации положительно коррелирует с нуклеотидным разнообразием, но не коррелирует с межвидовой дивергенцией (Rao et al., 2011). Так, выявлено, что изменение скорости рекомбинации объясняет более 30 % вариации в уровнях разнообразия среди 29 локусов (Mugal et al., 2013). Очевидно, естественный отбор – это основной фактор в формировании разнообразия молекулярных маркеров, включая SNP кур. Следовательно, есть основания предполагать, что местные уровни генетического разнообразия в геноме кур в основном определяются скоростью рекомбинации.

Импутация

Один из подходов для экономически эффективной реализации геномной селекции – оценка генотипа чипами с низкой плотностью маркеров. Для сравнения результатов с генотипом, полученным на чипах с высокой плотностью панели, применяют импутацию – метод перерасчета с соответствующими поправками. Информация, используемая для импутации, может состоять из сведений о неравновесии по сцеплению между маркерами, которые обнаруживаются в популяции в результате сегрегации и передачи сцепленных маркеров от родителей к потомству. В качестве альтернативы было предложено использовать чипы низкой плотности с равномерно разнесенными по геному SNP в сочетании с импутацией, чтобы оценить GEBV у кандидатов для использования в селекции (Habier et al., 2010). При таком подходе небольшое подмножество маркеров высокой плотности используется для оценки генотипа кандидатов в селекции.

Применение импутации значительно снижает затраты на генотипирование. Естественно, стоит вопрос о правомочности такой оценки и избежании ошибок. Проведенные исследования показали (Wang et al., 2013b), что геномный отбор может быть осуществлен путем генотипирования чипами с низкой плотностью маркеров и последующей импутацией с потерей точности менее чем на 6 %. Существует несколько программ, которые могут быть использованы для импутации генотипа, включая AlphaImpute (Hickey et al., 2011; Wang et al., 2013a) и Beagle (Browning B.L., Browning S.R., 2009). Средняя частота ошибок импутации генотипа для проверки особи определяется как среднее значение абсолютной разности

наблюдаемых и импутируемых генотипов (Zhang, Druet, 2010). Как было упомянуто, более высокая плотность SNP означает более высокую стоимость генотипирования, которая остается ключевым сдерживающим фактором в реализации GS в программах разведения животных. Импутация геномной информации стала стандартной практикой в современных генетических исследованиях с целью увеличения охвата генома и повышения точности GS и GWAS. Даже с небольшим числом животных в контрольной популяции может быть достигнута разумная точность расчетных данных (Heidaritabar et al., 2015). Высокая плотность SNP-генотипирования массивов является важным инструментом обнаружения генетических ассоциаций со сложными признаками и тонкой характеристикой локусов количественных признаков. В работе (Kranis et al., 2013) проведено генотипирование кур с помощью чипа 600K Affymetrix® Axiom® HD. По результатам секвенирования обнаружено около 196 млн предположительных SNP, из которых 1.8 млн были выбраны для генотипирования. Из них ~64 % SNP были полиморфными, со стабильным менделирующим наследованием. Окончательный массив включал 580954 SNP. Такое тонкое генотипирование будет полезным для GWAS, GS, картирования локусов количественных признаков, анализа генома для селекции и других геномных анализов. Важно, что при этих условиях можно осуществлять строгие критерии фильтрации, включающие частоту, локализацию в геноме и в структуре генов. При использовании таких методов имеется возможность более широкого охвата анализом микрохромосом.

Геномная оценка куриц и петухов

Для видов животных, таких как молочный скот, наибольшую выгоду получают от генотипирования производителей, в то время как коровы дают меньше потомства, а значит, их вклад в генетический прогресс ниже. В программах разведения цыплят-бройлеров петухи имеют меньше потомства по сравнению с быками, а курочки – гораздо больше, чем молочные коровы. Большинство производственных показателей у птиц регистрируется для обоих полов. Следовательно, в бройлерном птицеводстве более выгодно генотипирование обоих полов. Имеется информация о вкладе генотипов самцов и самок после обработки результатов генотипирования 15 723 бройлеров (Lourenco et al., 2014; Liu et al., 2015). Геномные оценки проведены в трех вариантах выборок: 4648 петухов, 8100 куриц и 12748 голов обоих полов. Можно отметить, что в случае использования референтной популяции одного пола наибольшую выгоду для молодых особей генотипированного поголовья получает птица того же пола. В целом генотипирование самцов и самок улучшает прогнозы всех молодых генотипированных особей, независимо от пола. Важной проблемой остается регистрация ложных или неопределенного уровня ценности ассоциаций с количественными признаками SNP и локусов в процессе геномной оценки (Brzyski et al., 2017). В разрешении таких задач главное значение приобретает использование оригинальных комплексов статистических обработок (Hormozdiari et al., 2014; Peterson et al., 2016).

Генетическую основу множественных фенотипов часто исследуют путем тестирования большой совокупности

гипотез, проверяющих существование ассоциации между каждым из признаков и сотнями тысяч генотипированных вариантов. В интересах интерпретируемости результаты часто суммируют, чтобы отчетность фокусировалась на вариантах, обнаруженных для связи с некоторыми фенотипами. Применение процедур контроля ложных ассоциаций (false discovery rate – FDR) по всему набору гипотез не позволяет контролировать скорость ложного обнаружения ассоциированных вариантов, а также ожидаемое значение средней доли ложного обнаружения фенотипов, на которые такие варианты влияют. Предлагаемые иерархические процедуры тестирования, позволяющие контролировать частоты ошибок, обеспечивают более надежную основу для идентификации вариантов с фенотипическими эффектами (Peterson et al., 2016).

Заключение

Технология геномной селекции на современном этапе развития имеет достаточный уровень для интенсивного внедрения в птицеводстве. Анализ маркеров и гаплотипов позволяет повышать точность племенной ценности куриц и петухов, регулировать генетическую гетерогенность, повышать скорость генетического прогресса. Совершенствование геномной селекции может идти по пути улучшения регистрации и математической обработки фенотипической и молекулярной базы данных, импутации и более глубокой оценки неравновесия по сцеплению.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-04060.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdollahi-Arpanahi R., Morota G., Valente B.D., Kranis A., Rosa G., Gianola D. Differential contribution of genomic regions to marked genetic variation and prediction of quantitative traits in broiler chickens. *Genet. Sel. Evol.* 2016;48:10. DOI 10.1186/s12711-016-0187-z.
- Aerts J., Megens H.J., Veenendaal T., Ovcharenko I., Crooijmans R., Gordon L., Stubbs L., Groenen M. Extent of linkage disequilibrium in chicken. *Cytogenet. Genome Res.* 2007;117(1-4):338-345. DOI 10.1159/000103196.
- Andreescu C., Avendano S., Brown S.R., Hassen A., Lamont S.J., Dekkers J.C. Linkage disequilibrium in related breeding lines of chickens. *Genetics.* 2007;177:2161-2169. DOI 10.1534/genetics.107.082206.
- Bai Y., Sun G., Kang X., Han R., Tian Y., Li H., Wei Y., Zhu S. Polymorphisms of the pro-opiomelanocortin and agouti-related protein genes and their association with chicken production traits. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39(7):7533-7539. DOI 10.1007/s11033-012-1587-y.
- Browning B.L., Browning S.R. A unified approach to genotype imputation and haplotype-phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.* 2009; 84(2):210-223. DOI 10.1016/j.ajhg.2009.01.005.
- Brzyski D., Peterson Ch.B., Sobczyk P., Candès E.J., Bogdan M., Sabbati C. Controlling the rate of GWAS false discoveries. *Genetics.* 2017;205(1):61-75. DOI 10.1534/genetics.116.193987.
- Cosart T., Beja-Pereira A., Luikart G. EXONSAMPLER: a computer program for genome-wide and candidate gene exon sampling for targeted next generation sequencing. *Mol. Ecol. Resour.* 2014;14(6): 1296-1301. DOI 10.1111/1755-0998.12267.

- Daetwyler H.D., Pong-Wong R., Villanueva B. The impact of genetic architecture on genome-wide evaluation methods. *Genetics*. 2010; 185:1021-1031. DOI 10.1534/genetics.110.116855.
- Daetwyler H.D., Villanueva B., Woolliams J.A. Accuracy of predicting the genetic risk of disease using a genome-wide approach. *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3395. DOI 10.1371/journal.pone.0003395.
- Dekkers J.C.M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 2004; 82(E-Suppl.):E313-E328.
- de Roos A.P.W., Hayes B.J., Spelman R.J., Goddard M.E. Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. *Genetics*. 2008;179(3):1503-1512. DOI 10.1534/genetics.107.084301.
- Do D.N., Janss L.L., Jensen J., Kadarmideen H.N. SNP annotation-based whole genomic prediction and selection: an application to feed efficiency and its component traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 2015;93:2056-2063. DOI 10.2527/jas.2014-8640.
- Elferink M.G., Megens H.J., Vereijken A., Hu X., Crooijmans R.P., Groenen M.A. Signatures of selection in the genomes of commercial and non-commercial chicken breeds. *PloS ONE*. 2012;7(2):e32720.
- Ennis S. Linkage disequilibrium as a tool for detecting signatures of natural selection. *Methods Mol. Biol.* 2007;376:59-70. DOI 10.1007/978-1-59745-389-9_5.
- Ewald S.J., Kapczynski D.R., Livant E.J., Suarez D.L., Ralph J., McLeod S., Miller C. Association of Mx1 Asn631 variant alleles with reductions in morbidity, early mortality, viral shedding, and cytokine responses in chickens infected with a highly pathogenic avian influenza virus. *Immunogenetics*. 2011;63:363-375. DOI 10.1007/s00251-010-0509-1.
- Fan W.L., Ng C.S., Chen C.F., Lu M.Y., Chen Y.H., Liu C.J., Wu S.M., Chen C.K., Chen J.J., Mao C.T., Lai Y.T., Lo W.S., Chang W.H., Li W.H. Genome-wide patterns of genetic variation in two domestic chickens. *Genome Biol. Evol.* 2013;5:1376-1392. DOI 10.1093/gbe/evt097.
- Fariello M.I., Boitard S., Naya H., SanCristobal M., Servin B. Detecting signatures of selection through haplotype differentiation among hierarchically structured populations. *Genetics*. 2013;193:929-941. DOI 10.1534/genetics.112.147231.
- Fu W., Dekkers J.C.M., Lee W.R., Abasht B. Linkage disequilibrium in crossbred and pure line chickens. *Genet. Sel. Evol.* 2015;47(1):11. DOI 10.1186/s12711-015-0098-4.
- Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., Roy J., Blumenstiel B., Higgins J., DeFelice M., Lochner A., Faggart M., Liu-Cordero S.N., Rotimi C., Adeyemo A., Cooper R., Ward R., Lander E.S., Daly M.J., Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296(5576):2225-2229. DOI 10.1126/science.1069424.
- García-Gómez E., Sahana G., Gutiérrez-Gil B. Linkage disequilibrium and inbreeding estimation in Spanish Churra sheep. *BMC Genet.* 2012;13:43. DOI 10.1186/1471-2156-13-43.
- Gholami M., Reimer C., Erbe M., Preisinger R., Weigend A., Weigend S., Servin B., Simianer H. Genome scan for selection in structured layer chicken populations exploiting linkage disequilibrium information. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0130497. DOI 10.1371/journal.pone.0130497.
- Groenen M., Megens H.J., Zare Y., Warren W.C., Hillier L.W., Crooijmans R.P., Vereijken A., Okimoto R., Muir W.M., Cheng H.H. The development and characterization of a 60K SNP chip for chicken. *BMC Genomics*. 2011;12:274. DOI 10.1186/1471-2164-12-274.
- Habier D., Fernando R.L., Dekkers J.C.M. The impact of genetic relationship information on genome-assisted breeding values. *Genetics*. 2007;177(4):2389-2397. DOI 10.1534/genetics.107.081190.
- Habier D., Tetens J., Seefried F.R., Lichtner P., Thaller G. The impact of genetic relationship information on genomic breeding values in German Holstein cattle. *Genet. Sel. Evol.* 2010;42:5. DOI 10.1186/1297-9686-42-5.
- Hayes B.J., Bowman P.J., Chamberlain A.J., Goddard M.E. Invited review: genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 2009;92:433-443. DOI 10.3168/jds.2008-1646.
- Heidaritabar M., Calus M., Vereijken A., Groenen M., Bastiaansen J. Accuracy of imputation using the most common sires as reference population in layer chickens. *BMC Genetics*. 2015;16:101. DOI 10.1186/s12863-015-0253-5.
- Heidaritabar M., Vereijken A., Muir W.M., Meuwissen T., Cheng H., Megens H.J., Groenen M.A., Bastiaansen J.W. Systematic differences in the response of genetic variation to pedigree and genome-based selection methods. *Heredity (Edinb.)*. 2014;13(6):503-513. DOI 10.1038/hdy.2014.55.
- Heifetz E.M., Fulton J.E., O'Sullivan N., Zhao H., Dekkers J.C., Soller M. Extent and consistency across generations of linkage disequilibrium in commercial layer chicken breeding populations. *Genetics*. 2005;171(3):1173-1181. DOI 10.1534/genetics.105.040782.
- Hickey J.M., Kinghorn B.P., Tier B., Wilson J.F., Dunstan N., van der Werf J.H. A combined long-range phasing and long haplotype imputation method to impute phase for SNP genotypes. *Genet. Sel. Evol.* 2011;43:12. DOI 10.1186/1297-9686-44-9.
- Hillier L.W., Miller W., Birney E., Warren W., Hardison R.C., Ponting C.P., Bork P., Burt D.W., Groenen M.A., Delany M.E., Dodgson J.B., Chinvala A.T., Clifton P.F., Clifton S.W., Delehaunty K.D. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*. 2004;432:695-716. DOI 10.1038/nature03154.
- Hindorf L.A., Sethupathy P., Junkins H.A., Ramos E.M., Mehta J.P., Collins F.S., Manolio T.A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106:9362-9367. DOI 10.1073/pnas.0903103106.
- Hormozdiari F., Kostem E., Kang Y., Pasaniuc B., Eskin E. Identifying causal variants at loci with multiple signals of association. *Genetics*. 2014;198:497-508. DOI 10.1534/genetics.114.167908.
- International HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437:1299-1320. DOI 10.1038/nature04226.
- International HapMap Consortium: A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449:851-861. DOI 10.1038/nature06258.
- Johansson A.M., Pettersson M.E., Siegel P.B., Carlborg O. Genome-wide effects of long-term divergent selection. *PLoS Genet.* 2010; 6(11):e1001188. DOI 10.1371/journal.pgen.1001188.
- Kim Y., Nielsen R. Linkage disequilibrium as a signature of selective sweeps. *Genetics*. 2004;167(3):1513-1524. DOI 10.1534/genetics.103.025387.
- Kindt A.S., Navarro P., Semple C.A., Haley C.S. The genomic signature of trait-associated variants. *BMC Genomics*. 2013;14:108. DOI 10.1186/1471-2164-14-108.
- Kizilkaya K., Fernando R.L., Garrick D.J. Genomic prediction of simulated multibreed and purebred performance using observed fifty thousand single nucleotide polymorphism genotypes. *J. Anim. Sci.* 2010;88:544-551. DOI 10.2527/jas.2009-2064.
- Koufariotis L., Chen Y.P., Bolormaa S., Hayes B.J. Regulatory and coding genome regions are enriched for trait associated variants in dairy and beef cattle. *BMC Genomics*. 2014;15:436. DOI 10.1186/1471-2164-15-436.
- Kranis A., Gheyas A.A., Boschiero C., Turner F., Yu L., Smith S., Talbot R., Pirani A., Brew F., Kaiser P., Hocking P.M., Fife M., Salmon N., Fulton J., Strom T.M., Haberer G., Weigend S., Preisinger R., Gholami M., Qanbari S., Simianer H., Watson K.A., Woolliams J.A., Burt D.W. Development of a high density 600K SNP genotyping array for chicken. *BMC Genomics*. 2013;14:59. DOI 10.1186/1471-2164-14-59.
- Liu R., Lourenco D.A.L., Fragomeni B.O., Tsuruta S. Accuracy of estimated breeding values with genomic information on males, females, or both: an example on broiler chicken. *Genet. Sel. Evol.* 2015; 47:56. DOI 10.1186/s12711-015-0137-1.
- Liu R., Wang Y.C., Sun D.X., Yu Y., Zhang Y. Association between polymorphisms of lipoprotein lipase gene and chicken fat deposition. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2006;19(10):1409-1414. DOI 10.5713/ajas.2006.1409.

- Livant E.J., Avendano S., McLeod S., Ye X., Lamont S.J., Dekkers J.C., Ewald S.J. MX1 exon 13 polymorphisms in broiler breeder chickens and associations with commercial traits. *Anim. Genet.* 2007;38:177-179. DOI 10.1111/j.1365-2052.2007.01577.x.
- Lourenco D.A.L., Misztal I., Tsuruta S., Aguilar I., Lawlor T.J., Forini S., Weller J.I. Are evaluations on young genotyped animals benefiting from the past generations? *J. Dairy Sci.* 2014;97:3930-3942. DOI 10.3168/jds.2013-7769.
- Lu D., Sargolzaei M., Kelly M., Li C., Vander Voort G., Wang Z., Plastow G., Moore S., Miller S.P. Linkage disequilibrium in Angus, Charolais, and Crossbred beef cattle. *Front. Genet.* 2012;3:152. DOI 10.3389/fgene.2012.00152.
- Megens H.J., Crooijmans R.P., Bastiaansen J.W., Kerstens H.H., Coster A., Jalving R., Vereijken A., Silva P., Muir W.M., Cheng H.H., Hanotte O., Groenen M.A. Comparison of linkage disequilibrium and haplotype diversity on macro- and microchromosomes in chicken. *BMC Genet.* 2009;10:86. DOI 10.1186/1471-2156-10-86.
- Meuwissen T.H., Hayes B.J., Goddard M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics.* 2001;157(4):1819-1829.
- Morota G., Abdollahi-Arpanahi R., Kranis A. Genome-enabled prediction of quantitative traits in chickens using genomic annotation. *BMC Genomics.* 2014;15:109. DOI 10.1186/1471-2164-15-109.
- Mugal C.F., Nabholz B., Ellegren H. Genome-wide analysis in chicken reveals that local levels of genetic diversity are mainly governed by the rate of recombination. *BMC Genomics.* 2013;14:86. DOI 10.1186/1471-2164-14-86.
- Pértille F., Guerrero-Bosagna C., Henrique da Silva V., Boschiero C., da Silva Nunes J.R., Ledur M.C., Jensen P., Coutinho L.L. High-throughput and cost-effective chicken genotyping using next-generation sequencing. *Sci. Rep.* 2016;6:26929. DOI 10.1038/srep26929.
- Peterson C.B., Bogomolov M., Benjamini Y. Many phenotypes without many false discoveries: error controlling strategies for multi-trait association studies. *Genet. Epidemiol.* 2016;40(1):45-56. DOI 10.1002/gepi.21942.
- Porto-Neto L.R., Kijas J.W., Reverter A. The extent of linkage disequilibrium in beef cattle breeds using high-density SNP genotypes. *Genet. Sel. Evol.* 2014;46:22. DOI 10.1186/1297-9686-46-22.
- Qanbari S., Hansen M., Weigend S., Preisinger R., Simianer H. Linkage disequilibrium reveals different demographic history in egg laying chickens. *BMC Genet.* 2010;11:103. DOI 10.1186/1471-2156-11-103.
- Rao Y., Sun L., Nie Q. The influence of recombination on SNP diversity in chickens. *Hereditas.* 2011;148(2):63-69. DOI 10.1111/j.1601-5223.2010.02210.x.
- Resnyk C., Carre W., Wang X., Porter T.E., Simon J., Le Bihan-Duval E., Duclos M.J., Aggrey S.E., Cogburn L.A. Transcriptional analysis of abdominal fat in genetically fat and lean chickens reveals adipokines, lipogenic genes and a link between hemostasis and leanness. *BMC Genomics.* 2013;14:557. DOI 10.1186/1471-2164-14-557.
- Sabeti P.C., Reich D.E., Higgins J.M., Levine H.Z., Richter D.J., Schaffner S.F., Gabriel S.B., Platko J.V., Patterson N.J., McDonald G.J., Ackerman H.C., Campbell S.J., Altshuler D., Cooper R., Kwiatkowski D., Ward R., Lander E.S. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature.* 2002;419:832-837. DOI 10.1038/nature01140.
- Sharma P., Bottje W., Okimoto R. Polymorphisms in uncoupling protein, melanocortin 3 receptor, melanocortin 4 receptor, and pro-opiomelanocortin genes and association with production traits in a commercial broiler line. *Poult. Sci.* 2008;87:2073-2086. DOI 10.3382/ps.2008-00060.
- Smaragdov M.G. Genomic selection as a possible accelerator of traditional selection. *Russ. J. Genet.* 2009;45(6):633-636. DOI 10.1134/S1022795409060015.
- Smith J.M., Haigh J. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet. Res.* 1974;23(1):23-35. DOI 10.1017/S0016672308009579.
- Solberg T.R., Sonesson A.K., Woolliams J.A., Odegard J., Meuwissen T.H. Persistence of accuracy of genome-wide breeding values over generations when including a polygenic effect. *Genet. Sel. Evol.* 2009;41:53. DOI 10.1186/1297-9686-41-53.
- Stainton J.J., Charlesworth B., Haley C.S., Kranis A., Watson K., Wiener P. Use of high-density SNP data to identify patterns of diversity and signatures of selection in broiler chickens. *J. Anim. Breed. Genet.* 2016;46(1):37-49. DOI 10.1111/jbg.12228.
- The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489:57-74. DOI 10.1038/nature11247.
- Wang C.L., Ding X.D., Wang J.Y., Liu J.F., Fu W.X., Zhang Z., Yin Z.J., Zhang Q. Bayesian methods for estimating GEBVs of threshold traits. *Heredity.* 2013a;110(3):213-219. DOI 10.1038/hdy.2012.65.
- Wang C., Habier D., Peiris B.L., Wolc A., Kranis A., Watson K.A., Avendano S., Garrick D.J., Fernando R.L., Lamont S.J., Dekkers J.C. Accuracy of genomic prediction using an evenly spaced, low-density single nucleotide polymorphism panel in broiler chickens. *Poultry Science.* 2013b;92(7):1712-1723. DOI 10.3382/ps.2012-02941.
- Wang J., Lin M., Crenshaw A., Hutchinson A., Hicks B., Yeager M., Berndt S., Huang W.Y., Hayes R.B., Chanock S.J., Jones R.C., Ramakrishnan R. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics.* 2009;10:561. DOI 10.1186/1471-2164-10-561.
- Weng Z., Wolc A., Shen X., Fernando R.L., Dekkers J.C., Arango J., Settar P., Fulton J.E., O'Sullivan N.P., Garrick D.J. Effects of number of training generations on genomic prediction for various traits in a layer chicken population. *Genet. Sel. Evol.* 2016;48:22. DOI 10.1186/s12711-016-0198-9.
- Wolc A., Arango J., Settar P., Fulton J.E., O'Sullivan N.P., Preisinger R., Habier D., Fernando R., Garrick D.J., Dekkers J.C. Persistence of accuracy of genomic estimated breeding values over generations in layer chickens. *Genet. Sel. Evol.* 2011;43:23. DOI 10.1186/1297-9686-43-23.
- Wragg D., Mwacharo J., Alcalde J., Hocking P.M., Hanotte O. Analysis of genome-wide structure, diversity and fine mapping of Mendelian traits in traditional and village chickens. *Heredity.* 2012;109:6-18. DOI 10.1038/hdy.2012.9.
- Yakovlev A.F., Smaragdov M.G. A significant increase in the accuracy of estimation of the breeding value of animals in dairy cattle. *Zootekhnika = Zootechnics.* 2011;5:2-4. (in Russian)
- Yang J., Manolio T.A., Pasquale L.R., Boerwinkle E., Caporaso N., Cunningham J.M., de Andrade M., Feenstra B., Feingold E., Hayes M.G., Hill W.G., Landi M.T., Alonso A., Lettre G., Lin P., Ling H., Lowe W., Mathias R.A., Melbye M., Pugh E., Cornelis M.C., Weir B.S., Goddard M.E., Visscher P.M. Genome partitioning of genetic variation for complex traits using common SNPs. *Nat. Genet.* 2011;43:519-525. DOI 10.1038/ng.823.
- Zhang H., Hu X., Wang Z., Zhang Y., Wang S., Wang N., Ma L., Leng L., Wang S., Wang Q., Wang Y., Tang Z., Li N., Da Y., Li H. Selection signature analysis implicates the *PC1/PCSK1* region for chicken abdominal fat content. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e40736. DOI 10.1371/journal.pone.0040736.
- Zhang Z., Druet T. Marker imputation with low-density marker panels in Dutch Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 2010;93:5487-5494. DOI 10.3168/jds.2010-3501.
- Zhao H., Nettleton D., Dekkers J.C.M. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. *Genet. Res.* 2007;89:91-96. DOI 10.1017/S0016672307008634.
- Zhou H., Mitchell A.D., McMurtry J.P., Ashwell C.M., Lamont S.J. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. *Poult. Sci.* 2005;84(2):212-219. DOI 10.1093/ps/84.2.212.

An association between type A porcine endogenous retrovirus copy number and hematological parameters and gender in miniature pigs

R.B. Aitnazarov^{1, 2}, S.V. Nikitin¹, G.V. Kontsevaya¹, M.I. Voevoda^{1, 2, 3}, N.S. Yudin^{1, 2, 3}✉

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Pig is the most promising species for transplantation of organs and cells into humans, although implementation of xenotransplantation in clinical practice has been hindered by the risk of infecting the recipient with zoonotic infectious diseases. Porcine endogenous retroviruses (PERV) are capable of incorporating copies of DNA into the genome of a host cell. Based on the nucleotide sequence of the envelope gene (*env*), three main types of pig retrovirus, PERV-A, PERV-B and PERV-C, have been recognized, with PERV-A and PERV-B having the capability of infecting human cell lines *in vitro*. Selection for animals with low copy number of retroviruses in the genome using simple phenotypic indications is required for the widespread implementation of xenotransplantation. The objective of this study was to evaluate the correlation between PERV-A *env* gene copy number and hematological parameters, gender and coat color in miniature pigs of the Institute of Cytology and Genetics (ICG) SB RAS. Reference values for eighteen blood parameters of miniature pigs were determined, including white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), platelet count (PLT), absolute (LYM#) and relative (LYM%) lymphocyte counts, absolute (MID#) and relative (MID%) monocyte, basophil and eosinophil counts, absolute (GRA#) and relative (GRA%) granulocyte counts, hematocrit (HCT) and thrombocrit (PCT), mean cell volume (MCV) and mean platelet volume (MPV). Males had significantly higher reference values for WBC, MID#, GRA# and red cell distribution width (RDW-CV) as compared to females. The mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and platelet distribution width (PDW-CV) were significantly higher in female animals. No correlation between PERV-A *env* gene copy number and the coat color of animals was detected, suggesting that retroviral insertion sites and genes that determine the coat color of miniature pigs, namely *KIT* (chromosome 8) and *MC1R* (chromosome 6), are either located far apart on same chromosome or on different chromosomes. The copy number of PERV-A *env* gene in males was lower than in females. Presence of multiple copies of PERV-A on the X-chromosome is the most probable cause of such gender-related differences in miniature pigs. Thus, male miniature pigs of ICG SB RAS should be the source of material for xenotransplantation.

Key words: xenotransplantation; miniature pigs of ICG SB RAS; porcine endogenous retrovirus; PERV; *envA* gene; gender; coat color; blood test.

Ассоциация числа копий эндогенных ретровирусов типа А с гематологическими показателями и полом у мини-свиней

Р.Б. Айтназаров^{1, 2}, С.В. Никитин¹, Г.В. Концевая¹, М.И. Воевода^{1, 2, 3}, Н.С. Юдин^{1, 2, 3}✉

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Свинья является наиболее перспективным видом для ксенотрансплантации органов и клеток человеку. Внедрение ксенотрансплантации в клиническую практику сдерживается возможным риском передачи реципиенту зоонозных инфекционных заболеваний. Эндогенные ретровирусы свиней (PERV) способны встраиваться в геном клетки в виде ДНК-копий. Три типа ретровирусов PERV – А, В и С – различаются по нуклеотидной последовательности гена *env*. PERV типа А и В могут инфицировать некоторые линии клеток человека *in vitro*. Для широкого внедрения ксенотрансплантации необходим поиск простых фенотипических признаков, по которым можно отбирать животных с наименьшим числом ретровирусов в геноме. Целью работы было выявление корреляции числа копий гена *envA* PERV с гематологическими показателями, полом и окраской у мини-свиней Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН. Были определены референсные значения восемнадцати параметров крови для мини-свиней, включая абсолютное содержание лейкоцитов (WBC), эритроцитов (RBC) и тромбоцитов (PLT), абсолютное (LYM#) и относительное (LYM%) содержание лимфоцитов, абсолютное (MID#) и относительное (MID%) содержание моноцитов, базофилов и эозинофилов, абсолютное (GRA#) и относительное (GRA%) содержание гранулоцитов, гематокрит (HCT) и тромбокрит (PCT), средний объем эритроцита (MCV) и тромбоцита (MPV). Показатели WBC, MID# и GRA#, а также относительная ширина распределения эритроцитов по объему (RDW-CV) у самцов были достоверно выше, чем у самок. Самки превосходили самцов по средней концентрации гемоглобина в эритроцитарной массе (MCHC) и относительной ширине распределения тромбоцитов по объему (PDW-CV). Корреляционный анализ показал отсутствие связи между числом копий гена *envA* PERV на клетку и окраской животных. По-видимому, сайты инсерции ретровирусов у мини-свиней либо нахо-

дятся на одной и той же хромосоме, но на значительном генетическом расстоянии от генов *KIT* (хромосома 8) и *MC1R* (хромосома 6), контролирующих окраску, либо локализованы с ними на разных хромосомах. Число копий гена *envA* PERV у самцов было ниже, чем у самок. Наиболее вероятной причиной гендерных различий является локализация нескольких копий PERV-A на X хромосоме мини-свиней. Таким образом, материал для ксенотрансплантации целесообразно брать у самцов миниатюрных свиней ИЦиГ СО РАН.

Ключевые слова: ксенотрансплантация; мини-свиньи ИЦиГ СО РАН; свиной эндогенный ретровирус; PERV; ген *envA*; пол; окраска; анализ крови.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Aitnazarov R.B., Nikitin S.V., Kontsevaya G.V., Voevoda M.I., Yudin N.S. An association between type A porcine endogenous retrovirus copy number and hematological parameters and gender in miniature pigs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):778-782. DOI 10.18699/VJ17.299

Today, in all countries of the world, the number of people with end-stage organ failure far exceeds the number of donor organs/cells available for transplantation. Xenotransplantation of organs/cells from pig to human offers a potential solution to this problem. Pig is the most promising species for xenotransplantation due to its anatomical and physiological similarity to humans, as well as for ethical and economic reasons (Ekser et al., 2015). However, the widespread implementation of xenotransplantation in clinical practice has been hampered by the risk of infecting the recipient with zoonotic infectious diseases.

Porcine endogenous retroviruses (PERV) are RNA-containing viruses that are capable of incorporating copies of DNA into the host cell's genome. Therefore, PERV cannot be eliminated by breeding pigs under specific pathogen-free conditions (Yudin et al., 2011). Since immunosuppressive therapy is mandatory after organ transplantation, the recipient has a high risk of developing PERV infection (Denner, 2016).

Based on the significant differences in the amino acid sequence of the receptor-binding domain of the *env* gene, which encodes a viral envelope protein, three main types of pig retrovirus, PERV-A, PERV-B and PERV-C, have been recognized. PERV-A and PERV-B infects not only porcine cell lines, but also several human cell lines *in vitro*, while PERV-C replicates only in porcine cells (Kimsa et al., 2014). Observations of patients treated with living porcine tissues or organs have not yet revealed the development of PERV infection in humans *in vivo* (Godehardt et al., 2015). It is not clear whether these data are due to real lack of virus production by pig cells or the result of effective inactivation of released virus particles by the immune system.

According to preliminary estimates, the pig genome contains 6 to 10 copies of replicable provirus, 30 to 50 full-length PERV copies and 100 to 200 loci containing partial PERV sequence (Niebert, Tonjes, 2005). The number of retroviral integration sites, generally, positively correlates with the level of viral mRNA expression (Ka et al., 2009). The existing methods for determining the copy number of PERV in the genome based on real-time PCR require special equipment and reagents, as well as highly skilled personnel. Identification of simple phenotypic indications allowing to select for animals with low copy number of retroviruses in the genome is required for the widespread implementation of xenotransplantation.

A unique breed of Siberian miniature pig was developed at the Institute of Cytology and Genetics (ICG) SB RAS for

biomedical applications by crossing pigs of Vietnamese Pot-bellied breed, Large White and Landrace breeds, and wild boars of Central Asian subspecies (Tikhonov, 2010). Using material from miniature pigs, studies are carried out to test and produce bioprosthetic heart valves, blood vessels and pericardial flap for intracardiac surgery and angioplasty. A technique for obtaining chondrotransplants from newborn miniature pigs to treat cartilage tissue dystrophic and traumatic changes in idiopathic scoliosis has been developed. Yet, PERV retroviruses of all three types are present in the genomes of most miniature pigs (Aitnazarov et al., 2014).

The objective of this study was to evaluate the correlation between PERV-A *env* gene copy number and hematological parameters, gender and coat color in miniature pigs of ICG SB RAS.

Materials and methods

1-month-old miniature pigs were obtained from the Common Use Center for "Gene pools of fur and farm animals" of ICG SB RAS. Gender and coat color were visually determined. Venous blood was collected in tubes containing anticoagulant (EDTA K-2). Automatic blood analyzer Hemascreeen 18P (Hospitex Diagnostics, Italy) was used to determine 18 hematological parameters. The study was conducted in strict compliance with the Helsinki Declaration on Humane Treatment of Animals.

Whole blood DNA isolation was performed with protease treatment and phenol extraction (Sambrook, Russel, 2006). The copy number of PERV-A *env* gene was determined by real-time PCR using standard samples prepared by the limiting dilution method (Aitnazarov et al., 2016) using Rotor-Gene Q (Qiagen, Netherlands). Amplification was carried out using a set of real-time PCR reagents with the SYBR Green I dye (Sintol, Russia) according to the manufacturer's protocol. For each DNA sample, PCR was performed at least three times. Data was processed with Rotor-Gene 6000 Series software, version 1.8.17.5. In the calculations, the genomic DNA amount was assumed equal in pig cells and human cells (6 pg DNA per cell). Since all investigated parameters, according to the Kolmogorov-Smirnov test, were normally distributed, a one-way analysis of variance and a correlation coefficient were used to assess the impact of factors. The arithmetic mean and standard error were calculated for each experimental group. The results were processed using STATISTICA 8 software.

Results and discussion

Data on PERV-A *env* gene copy number in blood cells from different groups of miniature pigs of ICG SB RAS are given in Table 1. The mean copy number for all studied animals (26.1, *n* = 40) significantly exceeds the value, which we previously obtained for pigs of the same breed (4.5, *n* = 10) (Aitnazarov et al., 2016). Influence of such factors as “boar genotype” and “sow genotype” on the PERV-A *env* gene copy number was insignificant ($F_{6,33} = 0.65, p = 0.69$ and $F_{14,25} = 1.08, p = 0.42$, respectively). The minimum/maximum values were 12.3/38.1 in the present study and 0.6/58.9 in the previous study, which confirms data from other authors stating significant differences between animals in this parameter (Liu et al., 2011). The observed differences might be related to a relatively small number of animals in our first study.

Table 1. PERV-A *env* gene copy number per cell in different groups of miniature pigs

Group	Number of animals	PERV-A <i>env</i> gene copy number per cell
Males	20	23.7 ± 1.5
Females	20	28.3 ± 1.3*
White	21	26.8 ± 1.5
Black	14	25.3 ± 1.8
Black-pied	5	24.3 ± 1.5

* *p* < 0.02 as compared to males.

Determination of retroviral genome copy number *in vivo* or *in silico* remains a difficult task. The alignment of primers used in our study to the Duroc pig genome, version Sscrofa10.2/susScr3 in the UCSC genomic browser, using Blat procedure allowed us to detect a total of seven copies: on chromosome 1 (two copies) and chromosomes 7, 8, 12, 13 and X (one copy each). However, this result may change when using another procedure and/or parameters for alignment. In addition to the individual differences mentioned above, it has been shown that the copy number of PERV retrovirus per cell may depend on the breed (Yu et al., 2007; Ma et al., 2010; Lee et al., 2011) and the examined organ (Zhang et al., 2010; Mazurek et al., 2013).

Earlier, based on the study of the prevalence of retrovirus in animals of different gender, we suggested that a copy(ies) of PERV-A is localized on the X-chromosome in pigs of the Large White breed of the Achinsk type (Aitnazarov et al., 2006). In our study, the copy number of PERV-A *env* gene in males was 16 % lower than in females (*p* < 0.02), which is about 4 copies per cell. The most likely cause of the observed differences is the localization of several PERV-A copies on the X-chromosome of miniature pigs. According to cytogenetic studies, PERV-A is localized on the X-chromosome in Australian Westran pigs, but is absent on the same chromosome in Large White and native Korean pig breeds (Jung et al., 2010).

A similar gender effect has been observed in other species of mammals. The copy number of *env* gene of endogenous human retrovirus, which has been associated with the development of multiple sclerosis, in peripheral blood mononuclear

Table 2. Values for hematological parameters and their correlation with PERV-A *env* gene copy number per cell in miniature pigs

Parameter	Males (<i>n</i> = 20)	Correlation coefficient, <i>r</i>	Females (<i>n</i> = 20)	Correlation coefficient, <i>r</i>
White blood cell count (WBC), ×10 ⁹ cells/L	14.97 ± 0.87	−0.09	12.15 ± 0.51##	0.23
Lymphocyte cell count (LYM#), ×10 ⁹ cells/L	9.16 ± 0.63	−0.06	8.26 ± 0.47	0.29
Monocyte, basophil and eosinophil count (MID#), ×10 ⁹ cells/L	3.63 ± 0.26	−0.13	2.58 ± 0.21##	0.04
Granulocyte count (GRA#), ×10 ⁹ cells/L	2.17 ± 0.29	−0.04	1.31 ± 0.15##	−0.17
Lymphocyte percentage (LYM%)	61.38 ± 2.53	−0.02	67.99 ± 2.35	0.17
Monocyte, basophil and eosinophil percentage (MID%)	24.03 ± 0.75	−0.09	21.18 ± 1.32	−0.08
Granulocyte percentage (GRA%)	14.60 ± 2.04	0.05	10.84 ± 1.19	−0.24
Red blood cell count (RBC), ×10 ¹² cells/L	7.46 ± 0.20	−0.15	7.18 ± 0.19	−0.15
Hematocrit (HCT), %	66.27 ± 1.52	0.06	65.60 ± 0.19	−0.01
Mean cell volume (MCV), fL	89.30 ± 1.86	0.27	91.95 ± 0.19	0.31
Red blood cell distribution width (RDW-CV), %	24.76 ± 1.66	−0.19	20.29 ± 0.76##	−0.19
Mean cell hemoglobin (MCH), pg/cell	16.33 ± 0.40	0.19	17.12 ± 0.20	0.09
Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), g/L	182.60 ± 1.34	−0.11	186.40 ± 0.98##	−0.55*
Hemoglobin (HGB), g/L	121.20 ± 3.33	0.00	122.35 ± 2.37	−0.17
Platelet count (PLT), ×10 ⁹ cells/L	316.40 ± 24.65	−0.27	309.65 ± 16.37	−0.14
Mean platelet volume (MPV), fL	11.17 ± 0.35	0.23	11.85 ± 0.21	0.22
Thrombocytocrit (PCT), %	36.16 ± 3.45	−0.16	36.88 ± 0.22	−0.05
Platelet distribution width (PDW-CV), %	43.62 ± 1.89	0.04	48.76 ± 1.34##	−0.18

* *p* < 0.01; ## *p* < 0.01 as compared to males.

cells is significantly higher in women as compared to men (Garcia-Montojo et al., 2013). According to the authors, this may be due to localization of at least two copies of retrovirus on the human X-chromosome. In cats, on the contrary, the copy number of *env* gene of endogenous retrovirus is higher in males than in females (Tandon et al., 2007). This is probably due to the localization of 3–5 provirus copies on the cat Y-chromosome (Roca et al., 2005).

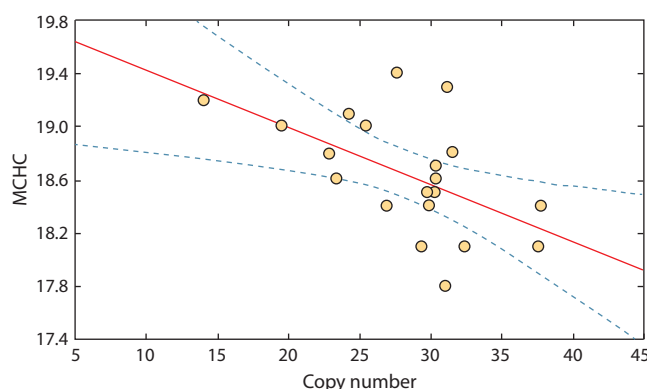
We did not identify reliable correlation between the PERV-A copy number per cell and the coat color of animals. In miniature pigs of ICG SB RAS and in pigs of other breeds, the white coat color is controlled by the *KIT* gene (genotypes I/I and I/i) located on chromosome 8. *MC1R* gene located on chromosome 6 controls black-pied (genotype E^P/E^P) and black (genotypes E^d/E^d , E^d/E and E^d/E^P) coat colors (Nikitin et al., 2016). It seems that retroviral insertion sites and genes that determine the coat color of miniature pigs are either located far apart on same chromosome or on different chromosomes.

A dilute viral (*dv*) coat-color mutation is known in inbred mice, caused by the insertion of murine leukemia virus Emv-3 into the intron of the *Myo5a* gene (Seperack et al., 1995). Insertion of retrovirus leads to alternative splicing and formation of a shorter form of myosin heavy-chain protein, which is encoded by *Myo5a* gene. It is believed that this protein is necessary for maintaining normal structure of dendrites and organelle transport in melanocytes. Feline leukemia virus is more common in animals with a solid, rather than spotted fur color (McMichael et al., 1986). Insertion of retrovirus into the 5' region of the aromatase gene in the Sebright chicken breed leads to the development of plumage color of roosters similar to the plumage color of hens (McPhaul et al., 1991).

Reference values for 18 haematological parameters of miniature pigs of ICG SB RAS have been determined (Table 2). All blood parameters were in agreement with the accepted physiological norms (Kondrakhin, 2004) and data obtained from other breeds of pigs (Rispat et al., 1993; Ekser et al., 2012; Kawaguchi et al., 2012). The white blood cell count (WBC), monocyte, basophil and eosinophil count (MID#) and granulocyte count (GRA#), as well as the red blood cell distribution width (RDW-CV) were significantly higher in males than in females. Females had higher mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and platelet distribution width (PDW-CV) as compared to males.

A study of 23 blood parameters in Japanese micro mini pigs has shown that basophil and lymphocyte counts were higher in females, but neutrophil count was higher in male animals (Kawaguchi et al., 2012). In Yucatan miniature pigs, the only detected difference between males and females was the higher platelet count in males (Rispat et al., 1993). The observed gender differences in hematological parameters between pigs of different breeds might be due to the influence of both genetic and environmental factors (feed, external conditions, etc.), as well as due to the different ages of studied animals.

No correlation between hematological parameters and the copy number of PERV-A *env* gene in blood cells of male miniature pigs has been detected. In females, a significant negative correlation was found between the copy number and the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) (Figure). Possibly, a copy(ies) of an active form of PERV-A



Correlation between PERV-A *env* gene copy number in blood cells and the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC, g/L) in female miniature pigs.

retrovirus causes disruption of genes that regulate hemoglobin level in females to a greater extent than in males.

It is known that hemoglobin level is on average 12 % lower in women than in men and this ratio is also observed in many species of mammals, birds and reptiles (Murphy, 2014). Since both genders have similar erythropoietin levels, it was hypothesised that oestrogens dilate and androgens constrict the renal microvasculature. Dilatation and vasoconstriction respectively increase and decrease the hematocrit in blood, providing a mechanisms for varying the red cell mass without changes in erythropoiesis.

Thus, material for xenotransplantation should be taken from male miniature pigs of ICG SB RAS, since they have a much lower copy number of PERV-A *env* gene as compared to females. It seems also promising to use some hematological parameters for this purpose, but this issue requires further investigation.

Acknowledgements

The work was supported by the RAS program (project No. 0324-2016-0010) and implemented using the equipment of the Center, supported by the Ministry of Education and Science of Russian Federation (unique identifier of the project RFMEFI62117X0015).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aitnazarov R.B., Ermolaev V.I., Nikitin S.V., Savina M.A., Kobzev V.F., Knyazev S.P., Goncharenko G.M., Bekenov V.A., Yudin N.S. Association of endogenous retroviruses of different types with genetic markers in populations of domestic and wild pigs. Proc. of the Russ. Academy of Agricult. Sci. 2006;4:39-43. (in Russian)
- Aitnazarov R.B., Yudin N.S., Kiril'chuk R.S., Kochnev N.N., Knyazev S.P., Voevoda M.I. Determination of the copy numbers of type A porcine endogenous retroviruses in domestic pigs and wild boars. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):756-761. DOI 10.18699/VJ16.192. (in Russian)
- Aitnazarov R.B., Yudin N.S., Nikitin S.V., Ermolayev V.I., Voevoda M.I. Identification of whole genomes of endogenous retroviruses in Siberian miniature pigs. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2014;4(6):523-525. DOI 10.1134/S2079059714060021.

- Denner J. How active are porcine endogenous retroviruses (PERVs)? *Viruses*. 2016; 8(8):E215. DOI 10.3390/v8080215.
- Ekser B., Bianchi J., Ball S., Iwase H., Walters A., Ezzelrab M., Veroux M., Gridelli B., Wagner R., Ayares D., Cooper D.K. Comparison of hematologic, biochemical, and coagulation parameters in $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene-knockout pigs, wild-type pigs, and four primate species. *Xenotransplantation*. 2012;19(6):342-354. DOI 10.1111/xen.12007.
- Ekser B., Cooper D.K., Tector A.J. The need for xenotransplantation as a source of organs and cells for clinical transplantation. *Int. J. Surgery*. 2015;23:199-204. DOI 10.1016/j.ijsu.2015.06.066.
- Garcia-Montojo M., Dominguez-Mozo M., Arias-Leal A., Garcia-Martinez Á., De las Heras V., Casanova I., Faucard R., Gehin N., Madeira A., Arroyo R., Curtin F., Alvarez-Lafuente R., Perron H. The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e53623. DOI 10.1371/journal.pone.0053623.
- Godehardt A.W., Rodrigues Costa M., Tönjes R.R. Review on porcine endogenous retrovirus detection assays – impact on quality and safety of xenotransplants. *Xenotransplantation*. 2015;22(2):95-101. DOI 10.1111/xen.12154.11.
- Jung W.Y., Kim J.E., Jung K.C., Jin D.I., Moran C., Park E.W., Jeon J.T., Lee J.H. Comparison of PERV genomic locations between Asian and European pigs. *Anim. Genetics*. 2010;41(1):89-92. DOI 10.1111/j.1365-2052.2009.01953.x.
- Ka S., Kerje S., Bornold L., Liljegren U., Siegel P.B., Andersson L., Hallböök F. Proviral integrations and expression of endogenous avian leucosis virus during long term selection for high and low body weight in two chicken lines. *Retrovirology*. 2009;6:68. DOI 10.1186/1742-4690-6-68.
- Kawaguchi H., Yamada T., Miura N., Takahashi Y., Yoshikawa T., Izumi H., Kawarasaki T., Miyoshi N., Tanimoto A. Reference values of hematological and biochemical parameters for the world smallest microminipigs. *J. Vet. Med. Sci.* 2012;74(7):933-936. DOI 10.1292/jvms.11-0571.
- Kimsa M.C., Strzalka-Mrozik B., Kimsa M.W., Gola J., Nicholson P., Lopata K., Mazurek U. Porcine endogenous retroviruses in xenotransplantation – molecular aspects. *Viruses*. 2014;6(5):2062-2083. DOI 10.3390/v6052062.
- Kondrakhin S.P. (Editor). *Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: Handbook*. M.: KolosS Publ., 2004. (in Russian)
- Lee D., Lee J., Yoon J.K., Kim N.Y., Kim G.W., Park C., Oh Y.K., Kim Y.B. Rapid determination of PERV copy number from porcine genomic DNA by real-time polymerase chain reaction. *Anim. Biotechnol.* 2011;22(4):175-180. DOI 10.1080/10495398.2011.595294.
- Liu G., Li Z., Pan M., Ge M., Wang Y., Gao Y. Genetic prevalence of porcine endogenous retrovirus in chinese experimental miniature pigs. *Transplant. Proc.* 2011;43(7):2762-2769. DOI 10.1016/j.transproceed.2011.06.061.
- Ma Y., Yang Y., Lv M., Yan Q., Zheng L., Ding F., Wu J., Tian K., Zhang J. Real-time quantitative polymerase chain reaction with SYBR green I detection for estimating copy numbers of porcine endogenous retrovirus from Chinese miniature pigs. *Transplant. Proc.* 2010;42(5):1949-1952. DOI 10.1016/j.transproceed.2010.01.054.
- Mazurek U., Kimsa M.C., Strzalka-Mrozik B., Kimsa M.W., Adam-ska J., Lipinski D., Zeyland J., Szalata M., Slomski R., Jura J., Smorag Z., Nowak R., Gola J. Quantitative analysis of porcine endogenous retroviruses in different organs of transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Curr. Microbiol.* 2013;67(4):505-514. DOI 10.1007/s00284-013-0397-3.12.
- McMichael J.C., Stiers S., Coffin S. Prevalence of feline leukemia virus infection among adult cats at an animal control center: association of viremia with phenotype and season. *Am. J. Vet. Res.* 1986;47(4):765-768.
- McPhaul M.J., Matsumine H., Herbst M.A., Wilson J.D. Aromatase expression in extragonadal tissues of the Sebright chicken is controlled by a retroviral promoter. *Trans. Assoc. Am. Physicians*. 1991;104:141-149.
- Murphy W.G. The sex difference in haemoglobin levels in adults – mechanisms, causes, and consequences. *Blood Rev.* 2014;28(2):41-47. DOI 10.1016/j.blre.2013.12.003.
- Niebert M., Tonjes R.R. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in suiformes. *J. Virol.* 2005;79(1):649-654.
- Nikitin S.V., Shatokhin K.S., Knyazev S.P., Goncharenko G.M., Zaporozhets V.I., Ermolaev V.I. Polymorphic loci of coat color in mini pigs. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20:584-595. (in Russian)
- Rispat G., Slaoui M., Weber D., Saleminck P., Berthouix C., Shrivastava R. Haematological and plasma biochemical values for healthy Yucatan micropigs. *Laboratory Animals*. 1993;27(4):368-373.
- Roca A.L., Nash W.G., Menninger J.C., Murphy W.J., O'Brien S.J. Insertional polymorphisms of endogenous feline leukemia viruses. *J. Virol.* 2005;79(7):3979-3986. DOI 10.1128/JVI.79.7.3979-3986.2005.
- Sambrook J., Russell D.W. *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2006.
- Seperack P.K., Mercer J.A., Strobel M.C., Copeland N.G., Jenkins N.A. Retroviral sequences located within an intron of the dilute gene alter dilute expression in a tissue-specific manner. *EMBO J.* 1995;14(10):2326-2332.
- Tandon R., Cattori V., Willi B., Meli M.L., Gomes-Keller M.A., Lutz H., Hofmann-Lehmann R. Copy number polymorphism of endogenous feline leukemia virus-like sequences. *Mol. Cell. Probes*. 2007;21(4):257-266. DOI 10.1016/j.mcp.2007.01.003.
- Tikhonov V.N. *Laboratory mini pigs, genetics and biomedical use*. Novosibirsk: Publ. House SB RAS, 2010. (in Russian)
- Yu P., Zhang L., Li S.F., Cheng J.Q., Lu Y.R., Zeng Y.Z., Li Y.P., Bu H. A rapid method for detection of the copy number of porcine endogenous in swine. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 2007;15(2):199-205. DOI 10.1111/j.1745-4581.2007.00082.x.
- Yudin N.S., Aitnazarov R.B., Ermolaev V.I. Porcine endogenous retroviruses: what are the risks of infection transmission in xenotransplantation? *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2011;1(6):532-539. DOI 10.1134/S207905971106013X.
- Zhang P., Yu P., Wang W., Zhang L., Li S., Bu H. An effective method for the quantitative detection of porcine endogenous retrovirus in pig tissues. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*. 2010;46(5):408-410. DOI 10.1007/s11626-009-9264-8.



Магнитно-резонансная спектроскопия нейрометаболитов гиппокампа и стриатума при синдроме посттравматических стрессорных расстройств

В.Э. Цейликман¹✉, О.Б. Шевелев², Н.В. Хоцкин², А.С. Доценко², Г.В. Концевая², М.С. Лапшин¹, М.П. Мошкин², М.В. Комелькова¹, И.В. Фекличева¹, О.Б. Цейликман¹, И.В. Дременков³, Е.Л. Завьялов²

¹ Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной физиологии и генетики, Академия наук Словакии, Братислава, Словацкая Республика

Методом ¹H магнитно-резонансной спектроскопии исследовали спектр метаболитов в дорзальной области гиппокампа и стриатума у крыс линии Wistar при экспериментальном моделировании синдрома посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР). Через 12 дней после завершения экспериментальной серии стрессорных воздействий, осуществляемых путем экспозиции запаха хищника (кота), у животных был определен уровень тревожности на основе индивидуальных особенностей поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». У крыс с высоким индексом тревожности (> 0.8) отмечены умеренное сниженное по сравнению с контролем содержание кортикостерона в плазме крови; со средними значениями индекса тревожности (0.7–0.8) – повышенный уровень кортикостерона; а с низким индексом тревожности (< 0.7) содержание кортикостерона резко снижено по сравнению с контролем. Крысы со средними значениями индекса тревожности (0.7–0.8) характеризуются повышенным уровнем гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в гиппокампе и N-ацетиласпартата в стриатуме. В остальных группах уровни всех исследуемых нейрометаболитов как в гиппокампе, так и в стриатуме не отличаются достоверно от контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что множественные экспозиции психологического стресса, связанного с ощущением близости естественного хищника, у части животных вызывают анксиолитическую реакцию. Для этой группы отмечено резкое снижение концентрации кортикостерона в сочетании с увеличенным содержанием N-ацетиласпартата в стриатуме. У крыс с наиболее высоким индексом тревожности наблюдалось умеренное снижение содержание кортикостерона. При этом количество нейрометаболитов в гиппокампе и стриатуме находилось в пределах контрольных значений. У крыс с промежуточным уровнем тревожности отмечена синхронизация между приростом содержания кортикостерона в плазме крови и содержания ГАМК в гиппокампе. Полученные результаты хорошо согласуются с представлениями о протекторном действии глюкокортикоидов в условиях ПТСР, проявляющемся в сдерживании нарушений психофизиологического статуса. Материалы исследования позволяют детализировать нейробиологические механизмы протекторного действия глюкокортикоидов.

Ключевые слова: ПТСР; нейрометаболиты; кортикостерон; индекс тревожности.

Magnetic resonance spectroscopy of hippocampal and striatal neurometabolites in experimental PTSD rat modeling

V.E. Tseilikman¹✉, O.B. Shevelev², N.V. Khotskin², A.S. Dotsenko², G.V. Kontsevaya², M.S. Lapshin¹, M.P. Moshkin², M.V. Komelkova¹, I.V. Feklicheva¹, O.B. Tseilikman¹, E. Dremencov³, E.L. Zavjalov²

¹ South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

The spectrum of the metabolites in the dorsal region of the hippocampus and striatum was studied using the method of ¹H magnetic resonance spectroscopy at experimental modeling of the posttraumatic stress disorder syndrome (PTSD) in rats. PTSD was reproduced by exposure of the cat cue to rats daily along 10 day by 10 minutes at once. The anxiety level of animals was estimated 12 days later after the end of the experimental series of stress. Based on the anxiety index, the rats were divided into 3 phenotypes. The animals with an anxiety index > 0.8 (group 1) had lower plasma corticosterone compared with rats from the control group. In animals with an anxiety index in the range 0.7–0.8 (group 2), an elevated corticosterone level was noted. The rats with an anxiety index < 0.7 (group 3) had a lower plasma corticosterone level compared with animals from the control group. Rats of group 2 were characterized by an increased level of GABA in the hippocampus compared with controls. In the remaining groups, the percentages of GABA in the hippocampus and striatum did not differ significantly from the control. The distribution of NAA differed from that of GABA. The highest level of NAA was found in the striatum for rats from group 1, whereas NAA in animals from groups 1 or 3 did not differ from the control. The NAA level in the hippocampus was similar between all groups, including the control. The results obtained indicate that multiple exposures to psychological stress associated with the sense of proximity of a natural enemy in some animals cause an anxiolytic

reaction. These animals are characterized by a stable corticosterone level and a stable level of neurometabolites in the studied structures of the brain. For rats with the highest level of anxiety, a lowered level of corticosterone with a constant level of neurometabolites in the hippocampus and striatum is characteristic. And only in rats with an intermediate level of anxiety, synchronization was observed between the increase in plasma corticosterone and the increase in hippocampal GABA content. The results obtained are in good agreement with the ideas of the protective action of glucocorticoids under PTSD manifested in restraining violations of the psycho-physiological status. The materials allow the neurobiological mechanisms of the protective action of glucocorticoids to be detailed.

Key words: PTSD; neurometabolites; corticosterone; anxiety index.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Цейликман В.Э., Шевелев О.Б., Хоцкин Н.В., Доценко А.С., Концевая Г.В., Лапшин М.С., Мошкин М.П., Комелькова М.В., Фекличева И.В., Цейликман О.Б., Дременков И.В., Завьялов Е.Л. Магнитно-резонансная спектроскопия нейрометаболитов гиппокампа и стриатума при синдроме посттравматических стрессорных расстройств. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):783-787. DOI 10.18699/VJ17.293

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Tseilikman V.E., Shevelev O.B., Khotskin N.V., Dotsenko A.S., Kontsevaya G.V., Lapshin M.S., Moshkin M.P., Komelkova M.V., Feklicheva I.V., Tseilikman O.B., Dremencov E., Zavjalov E.L. Magnetic resonance spectroscopy of hippocampal and striatal neurometabolites in experimental PTSD rat modeling. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):783-787. DOI 10.18699/VJ17.293 (in Russian)

Состояние посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР) возникает как отсроченная реакция на опасные для жизни психологические травмы, такие как боевой стресс во время военной службы, дорожно-транспортные происшествия, стихийные бедствия или террористические нападения (Pitman et al., 2012). ПТСР связано с хроническим психологическим расстройством, которое часто способствует развитию как психических, так и соматических заболеваний. Однако не у всех переживших психологическую травму в дальнейшем развивается ПТСР. В общей когорте лиц, переживших чрезмерные для психического здоровья воздействия, выделяют устойчивых и предрасположенных к развитию симптомов ПТСР (Cohen, Zohar, 2004). Несмотря на многочисленные клинко-экспериментальные исследования, проводимые в различных исследовательских центрах на протяжении последних 30 лет, природа устойчивости к ПТСР остается неизвестной. Тем не менее имеются определенные клинические и экспериментальные наблюдения, которые представляются полезными для выбора главного направления в изучении механизмов развития устойчивости и восприимчивости к ПТСР. Весьма впечатляют данные о том, что введение кортизола лицам, попавшим в автомобильные катастрофы, предупреждает развитие ПТСР (Zohar et al., 2011). Между тем имеются клинические данные о том, что для больных ПТСР характерно наличие низкого уровня кортизола (Yehuda, Seckl, 2011). Следовательно, представляется уместной постановка вопроса о наличии нейропротекторного действия глюкокортикоидов, которое целесообразно рассматривать в качестве механизма устойчивости к развитию симптомов ПТСР в отдаленный период после развития психологической травмы. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этого феномена, до сих пор не изучены.

Гиппокамп, будучи ведущим когнитивным центром, играет важную роль в развитии устойчивости к стрессорным ситуациям (McEwen, 2017). Более того, комплекс гиппокамп–стриатум включен в формирование активной поведенческой стратегии антистрессорного характера (De Kloet, 2014). При этом гиппокамп вместе с миндалиной и префронтальной корой относятся к глюкокортикоид-зависимым регионам головного мозга (McEwen, 2017). В последнее время появляются данные об участии гиппокампа в торможении тревоги и агрессии. Причем в нейробиологические механизмы, обеспечивающие это полезное свойство гиппокампа, вовлечены такие нейрометаболиты, как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) и N-ацетиласпартат (Szulc et al., 2011), которые могут быть задействованы и в стриатуме при функционировании комплекса гиппокамп–стриатум. Однако не понятно, как изменение уровня глюкокортикоидов соотносится с изменениями уровня нейрометаболитов в гиппокампе и в стриатуме при экспериментальном моделировании ПТСР у животных, предрасположенных и устойчивых к развитию ПТСР. В настоящее время разделение на восприимчивых и устойчивых к экспериментальному ПТСР проводится на основе предложенного индекса тревожности (Cohen, Zohar, 2004). Целью настоящего исследования было изучение сопряженности изменений индекса тревожности, уровня кортикостерона и содержания нейрометаболитов в гиппокампе и стриатуме у крыс линии Wistar при экспериментальном моделировании ПТСР.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Исследование проведено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) на 24 половозрелых самцах крыс ли-

нии Wistar, которых содержали однополовыми семейными группами по две особи в индивидуально вентилируемых клетках системы Tecniplast при световом режиме свет/темнота 14/10 ч. Корм Sniff (Германия) и воду животным предоставляли *ad libitum*.

Общий протокол. Крысы были разделены на две группы: контрольные ($n = 7$) и стрессированные ($n = 17$). Моделирование развития ПТСР проводили экспозицией кошачьей мочи. В течение 10 дней ежедневно в клетки с экспериментальными животными на 10 мин помещали древесные опилки, пропитанные мочой домашнего кота. На протяжении последующих 10 дней дополнительные воздействия не проводились. На 21-й день крыс рассаживали в индивидуальные клетки и затем на 23-й день исследовали их поведенческую активность. На 25-й день производили забор крови из хвостовой вены и на 26-й день проводили магнитно-резонансную спектроскопию (МРС) нейрометаболитов в гиппокампе и стриатуме.

Определение поведенческой активности. Оценку эмоциональной реакции тревоги у крыс проводили в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» в течение 600 с (10 мин). В качестве интегрального показателя, характеризующего наличие тревожных расстройств, использовали индекс тревожности (ИТ), вычисляемый по следующей формуле (Cohen et al., 2008):

$$\text{ИТ} = 1 - \left(\frac{\text{Время в открытых руках}}{\sum \text{Время в лабиринте}} + \frac{\text{Количество заходов в открытые рукава}}{\sum \text{Общее количество заходов}} \right) / 2.$$

На основании значений ИТ животные, подвергнутые ПТСР, были разделены на три фенотипа: фенотип 1 – животные с $\text{ИТ} < 0.7$ ($n = 4$); фенотип 2 – с $0.7 \leq \text{ИТ} \leq 0.8$ ($n = 5$); фенотип 3 – с $\text{ИТ} > 0.8$ ($n = 8$).

Магнитно-резонансная спектроскопия гиппокампа и стриатума. Измерения проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). За 5 мин до исследования крыс обездвигивали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали благодаря использованию водного контура в томографическом столике-кроватьке ($t = 30^\circ\text{C}$). Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N. Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

Все протонные спектры гиппокампа и стриатума крысы получены с использованием передающей объемной (500.3 МГц, диаметр 72/89 мм) и приемной поверхностной (500.3 МГц, размер $123 \times 64 \times 31$ мм) ^1H радиочастотных катушек. Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей были сняты T2-взвешенные изображения головного мозга крысы высокого разрешения методом RARE (rapid with relaxation enhancement) с параметрами импульсной последовательности $\text{TE} = 11$ мс, $\text{TR} = 2.5$ с (толщина среза 0.5 мм, поле обзора 2.5×2.5 см, размер матрицы 256×256 точек). Все протонные спектры получены с помощью пространственно-локализованной одновоксельной спектроскопии методом STEAM (stimulated echo

acquisition mode spectroscopy) с параметрами импульсной последовательности $\text{TE} = 3$ мс, $\text{TR} = 5$ с и количеством накоплений 100. Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя при использовании методики FastMap. Подавление сигнала воды в спектрах осуществляли с помощью импульса переменной мощности и оптимизированной задержки релаксационной последовательности (VAPOR).

Для обработки экспериментальных спектров ^1H МРС и определения количественного состава метаболитов применяли оригинальную специализированную компьютерную программу, основанную, как и программный пакет LCModel (Provencher, 1993), на предположении о том, что спектр смеси известных соединений представляет собой линейную комбинацию спектров анализируемых компонентов. Подробное описание работы программы представлено в статье (Moshkin et al., 2014).

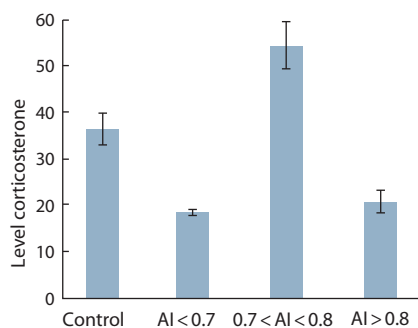
Содержание кортикостерона. Содержание кортикостерона определяли в плазме крови после предварительной экстракции иммуноферментным методом (Cusabio ELISA Kit) в соответствии с протоколом производителя. Чувствительность определения составила 0.25 нг/мл, вариативность $< 5\%$.

Статистическая обработка. Для обработки полученных результатов применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Достоверность различий между фенотипами исследуемых животных оценивали с помощью *post hoc* теста (Fisher). Значения исследованных параметров представлены в виде средних и ошибки средней ($\text{Mean} \pm \text{SE}$).

Результаты

В суммарной выборке животных, подвергнутых повторным стрессорным воздействиям, не наблюдалось статистически значимых изменений ИТ, а также содержания кортикостерона и нейрометаболитов в гиппокампе и стриатуме. Однако разделение стрессированных крыс на три фенотипа (рисунок) позволило выявить статистически значимые различия по уровню кортикостерона ($F_{3,21} = 4.53$; $p < 0.05$).

Установлено, что у крыс, условно отнесенных к первому ($\text{ИТ} < 0.7$) и третьему ($\text{ИТ} > 0.8$) фенотипам, содержание кортикостерона снижено по сравнению с контролем ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно). Крысы с ИТ от 0.7 до 0.8 имели более высокие значения кортикостерона в плазме крови, чем животные из контрольной группы ($p < 0.05$). После завершения повторных стрессорных воздействий также наблюдались статистически значимые различия по содержанию ГАМК в гиппокампе ($F_{3,21} = 5.13$; $p < 0.05$). При этом у крыс второго фенотипа содержание ГАМК в гиппокампе было выше, чем у контрольных крыс и животных первого и третьего фенотипов (таблица). Между тем у крыс этих подгрупп отсутствовали статистически значимые различия с контролем. По содержанию других нейрометаболитов в гиппокампе не обнаружено статистически значимых различий как по сравнению с контролем, так и между отдельными подгруппами. В стриатуме из всех исследованных нейрометаболитов только по отношению к N-ацетиласпартату обнаружены статистически значи-



Blood corticosterone levels in animals with different anxiety indices (AI).

мые различия ($F_{3,21} = 4.47$; $p < 0.05$). При этом наиболее высокий уровень N-ацетиласпартата наблюдали у животных, относящихся к первому фенотипу. У крыс этой подгруппы содержание N-ацетиласпартата было выше, чем у контрольных и животных второго или третьего фенотипов.

Обсуждение

В ходе исследования установлено соотношение между изменениями индекса тревожности, уровня кортикостерона и содержания ГАМК в гиппокампе спустя 14 дней после завершения повторных стрессорных воздействий. Следует отметить, что в группе стрессированных животных выявлялся фенотип крыс, у которых индекс тревожности снижался по сравнению с контролем. Именно эту подгруппу животных можно рассматривать как фенотип, устойчивый к развитию тревожной симптоматики ПТСР. У этих крыс содержание кортикостерона было резко снижено по сравнению с контролем при повышенном уровне N-ацетиласпартата в стриатуме. В то же время содержание нейрометаболитов в гиппокампе не отличалось статистически значимо от контроля.

Таким образом, животные, устойчивые к развитию тревожной симптоматики ПТСР, характеризуются наиболее низким уровнем кортикостерона. Согласно данным, полученным на животных, содержащихся в условиях конвенционального вивария, при воспроизведении этой экспериментальной модели ПТСР у крыс с резко пониженным уровнем кортикостерона отмечен низкий индекс тревожно-

Percentages of neurometabolites GABA and N-acetylaspartate in the hippocampus and striatum of rats with different AIs in PTSD modeling

	Control	Phenotype 1, AI < 0.7	Phenotype 2, 0.7 ≤ AI ≤ 0.8	Phenotype 3, AI > 0.8
GABA; hippocampus, %	7.65 ± 0.45	8.28 ± 0.61	13.07 ± 0.9*	7.79 ± 0.89
N-acetylaspartate; hippocampus, %	16.31 ± 4.67	16.58 ± 5.24	15.29 ± 4.78	16.71 ± 5.46
GABA; striatum, %	6.37 ± 0.94	6.21 ± 1.45	5.50 ± 0.96	5.23 ± 0.67
N-acetylaspartate; striatum, %	14.75 ± 1.26	18.61 ± 1.29*	14.32 ± 0.98	15.57 ± 0.87

* Difference from the control significant at $p < 0.05$.

сти. У крыс с умеренным понижением уровня кортикостерона установлено повышение уровня тревожности при одновременном снижении уровня замирания (Кондашевская и др., 2017). Поэтому неуместно говорить о фенотипе устойчивости к ПТСР в целом. Нам представляется более корректным рассматривать устойчивость к определенным симптомам ПТСР. Причем между устойчивостью к тревожной симптоматике и устойчивостью к депрессивной симптоматике можно проследить обратную зависимость.

Механизмы сниженного уровня глюкокортикоидов при ПТСР могут быть связаны с развитием надпочечниковой недостаточности. Ранее нами было показано, что данный режим повторных стрессорных воздействий характеризуется дистрофией пучковой зоны коры надпочечников (Kondashevskaya et al., 2017). Более того, отмечены корреляции между уровнем тревожности и гистологическими показателями пучковой зоны коры надпочечников.

В ходе исследований на основе показателей индекса тревожности удалось выявить подгруппу животных с умеренной ПТСР-симптоматикой. Именно у них отмечается наиболее резкий прирост уровня кортикостерона, которому соответствовали наиболее высокие значения ГАМК и N-ацетиласпартата в гиппокампе. Вполне возможно, что прирост этих показателей зависит от уровня глюкокортикоидов. Не исключено, что подобное изменение уровня нейрометаболитов в этих структурах мозга отражает напряжение нейробиологических механизмов регуляции поведенческой активности, препятствующих дальнейшему усугублению ПТСР-симптоматики.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project 17.7255.2017/8.9. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Cohen H., Matar M.A., Buskila D., Kaplan Z., Zohar J. Early poststressor intervention with high-dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry*. 2008;64:708-717. DOI 10.1016/j.biopsych.2008.05.025.
- Cohen H., Zohar J. An animal model of posttraumatic stress disorder: the use of cut-off behavioral criteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1032:167-178.
- De Kloet E.R. From receptor balance to rational glucocorticoid therapy. *Endocrinology*. 2014;155(8):2754-2769. DOI 10.1210/en.2014-1048.
- Kondashevskaya M.V., Tseilikman V.E., Manukhina E.B., Downey H.F., Komelkova M.V., Lapshin M.S., Samoylov E.A., Aliluev A.V., Kurganov A.S., Kozochkin D.A., Maltseva N.B., Tseilikman O.B. Disorder in the morphology and functions of adrenal glands in experimental posttraumatic stress disorder in rats: correlation with behavioural markers. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2017.

- Kondashevskaya M.V., Tseylikman V.E., Manukhina E.B., Downey H.F., Komelkova M.V., Lapshin M.S., Samoylov E.A., Aliyev A.V., Kurganov A.S., Maltseva N.V., Tseylikman O.B. Correlation between behavior and morphofunctional changes in the adrenal glands in modeling of the syndrome of posttraumatic stress disorders in Wistar rats. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2017;103(7):808-818. (in Russian)
- McEwen B.S. Allostasis and the epigenetics of brain and body health over the life course: The brain on stress. *JAMA Psychiatry*. 2017; 74(6):551-552. DOI 10.1001/jamapsychiatry.2017.0270.
- Moshkin M.P., Akulov A.E., Petrovski D.V., Saik O.V., Petrovsky E.D., Savelov A.A., Kpotug I.V. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D-glucose and lipopolisaccharides. *NMR Biomed*. 2014;27(4):399-405. DOI 10.102/nbm.3074.
- Pitman R., Rasmusson A., Koenen K., Shin L., Orr S., Gilbertson M., Milad M., Liberzon I. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat. Rev. Neurosci*. 2012;13(11):769-787. DOI 10.1038/nrn3339.
- Provencher S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med*. 1993;30(6): 672-679.
- Szulc A., Galinska B., Tarasow E., Waszkiewicz N., Konarzewska B., Poplawska R., Bibulowicz D., Simonienko K., Walecki J. Proton magnetic resonance spectroscopy study of brain metabolite changes after antipsychotic treatment. *Pharmacopsychiatry*. 2011;44(4):148-157. DOI 10.1055/s-0031-1279739.
- Yehuda R., Seckl J.J. Minireview: Stress-related psychiatric disorders with low cortisol levels: a metabolic hypothesis. *Endocrinology*. 2011; 152(12):4496-4503. DOI 10.1210/en.2011-1218.
- Zohar J., Yahalom H., Kozlovsky N., Cwikel-Hamzany S., Matar M.A., Kaplan Z., Yehuda R., Cohen H. High dose hydrocortisone immediately after trauma may alter the trajectory of PTSD: interplay between clinical and animal studies. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 2011;21(11):796-809. DOI 10.1016/j.euroneuro.2011.06.001.

Поведенческие и нейрональные реакции на кон- и гетероспецифические обонятельные сигналы у двух видов мышей – *Mus musculus* и *Mus spicilegus*

Е.В. Котенкова¹✉, А.В. Ромащенко^{2, 3}, А.Н. Мальцев¹

¹ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Исследованы поведенческие и нейрональные ответы самцов двух близкородственных видов мышей (*Mus musculus wagneri* и *M. spicilegus*) на запах мочи самок своего и близкородственного видов в состоянии эструса. Поведенческие тесты, проведенные с помощью методики парного предъявления источников запаха, показали, что самцы достоверно дольше исследуют запах самок-конспецификов по сравнению с запахом гетероспецификов. Для исследования нейрональной активации в основной и дополнительной обонятельных луковицах (ОЛ) использовали один из методов функциональной томографии – марганец-усиленную магнитно-резонансную томографию (МУМРТ). При предъявлении самцам *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* запаха конспецифичной самки по сравнению с самцами контрольной группы (запах не экспонировали) наблюдалось достоверное увеличение накопления Mn^{2+} в дорсальном отделе задней части основной ОЛ. При экспозиции запаха гетероспецифичной самки локальное достоверное увеличение накопления контраста происходило в дорсальной области передней части основной ОЛ. Запах гептанона-2 не только вызывал увеличение накопления контраста в определенных зонах, но и значительно снижал накопление Mn^{2+} в остальной части ОЛ. У самцов наблюдалось достоверное увеличение накопления МУМРТ-контраста в дополнительной ОЛ только в случае предъявления запаха мочи самок-конспецификов. Результаты работы подтверждают высказанное ранее предположение о существенной разнице между системами химической коммуникации у двух видов мышей. При сопоставлении данных этого исследования с ранее полученными не выявлено различий в поведенческих и нейрональных реакциях у аллопатрически (*M. m. wagneri*) и симпатрически (*M. m. musculus*) распространенных с *M. spicilegus* подвидов домового мыши. Это не позволяет предполагать действие в процессе эволюции механизма «усиления» при формировании прекопуляционной репродуктивной изоляции между симпатрическими видами *M. spicilegus* и *M. musculus*.

Ключевые слова: домовые мыши; *M. spicilegus*; *M. musculus*; обонятельные сигналы; марганец-усиленная томография; дополнительная обонятельная система; основная обонятельная система.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Котенкова Е.В., Ромащенко А.В., Мальцев А.Н. Поведенческие и нейрональные реакции на кон- и гетероспецифические обонятельные сигналы у двух видов мышей – *Mus musculus* и *Mus spicilegus*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):788-794. DOI 10.18699/VJ17.294

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kotenkova E.V., Romashchenko A.V., Maltsev A.N. Behavioral and neuronal responses of two mouse species, *Mus musculus* and *Mus spicilegus*, to con- and heterospecific olfactory signals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):788-794. DOI 10.18699/VJ17.294 (in Russian)

Received 06.10.2017

Accepted for publication 30.10.2017

© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: evkotenkova@yandex.ru

Behavioral and neuronal responses of two mouse species, *Mus musculus* and *Mus spicilegus*, to con- and heterospecific olfactory signals

E.V. Kotenkova¹✉, A.V. Romashchenko^{2, 3},
A.N. Maltsev¹

¹ Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Computational Technologies SB RAS, Novosibirsk, Russia

The behavioral and neuronal responses of the males of two closely related species of mice (*Mus musculus wagneri*, *M. spicilegus*) to the urine odors of estrus con- and heterospecific females were studied. In two-choice odor tests males significantly longer investigated odor of conspecific females in comparison with heterospecific ones. To investigate neuronal activation in the main and accessory olfactory bulbs (MOB and AOB), one of the methods of functional tomography – manganese-enhanced MRI (ME-MRI) – was used. There was a significant increase in Mn^{2+} accumulation in the dorsal section of the posterior part of the MOB in male *M. m. wagneri* and *M. spicilegus* exposed to odor of conspecific females compared with the control group males (odor not exposed). There was a local significant increase in manganese accumulation in the dorsal region of the anterior part of the MOB in the case of the exposure of odor of a heterospecific female. The exposure of heptanone-2 to mice resulted not only in an increase in Mn^{2+} accumulation in certain zones, but also in a significant decrease in the accumulation of Mn^{2+} in the rest of the olfactory bulbs. A significant increase in the accumulation of MRI contrast in AOB was observed in males only in the case of female urine-conspecific odor exposure. The results support the previously stated assumption of a significant difference in chemical communication systems in two species of mice. A comparison of these results and results obtained previously demonstrated the absence of any differences in behavioral and neuronal responses to con- and heterospecific odors of the house mouse subspecies allopatriк (*M. m. wagneri*) and sympatric (*M. m. musculus*) to *M. spicilegus*. This fact does not allow us to assume the effect of the mechanism of “reinforcement” in the process of evolution in the formation of precopulatory reproductive isolation between the sympatric species *M. spicilegus* and *M. musculus*.

Key words: house mice; *M. spicilegus*; *M. musculus*; olfactory signals; manganese-enhanced tomography; additional olfactory system; main olfactory system.

Химическая коммуникация – ведущая форма обмена информацией у большинства видов мелких грызунов, при этом реакция на обонятельные сигналы может носить врожденный характер или формироваться и модифицироваться в результате раннего опыта (Doty, 2010; Суров, Мальцев, 2016; Котенкова и др., 2017). Мыши всех видов надвидового комплекса *Mus musculus sensu lato* распознают по запаху представителей своего и близкородственных видов независимо от их возраста и половой принадлежности, что лежит в основе выбора конспецифичного полового партнера, а, следовательно, и функционирования механизмов прекопуляционной этологической изоляции (Котенкова, 2014). Близкородственные виды домовых мышей при парном предъявлении достоверно дольше исследуют или остаются около источника запаха конспецификов по сравнению с гетероспецификами (Соколов и др., 1990; Kotenkova, Naidenko, 1999; Heth et al., 2001). Существенная значимость обонятельных сигналов как механизмов прекопуляционной изоляции показана для симпатрических видов домовых мышей (*M. musculus* и *M. spicilegus*) (Соколов и др., 1990; Kotenkova, Naidenko, 1999; Вознесенская и др., 2010). Способность различать запахи особей своего и других близких аллопатрических, парапатрических и симпатрических видов выявлена и у других таксонов домовых мышей (Christophe, Baudoin, 1998; Kotenkova, Naidenko, 1999; Smadja, Ganem, 2008). При использовании метода иммуногистохимического окрашивания с применением первичных антител против белка Fos для визуализации нейрональной активности в сенсорном эпителии вомероназального органа (ВНО) у самцов *M. domesticus* и *M. spicilegus* в ответ на экспозицию запаха самок-гетероспецификов в состоянии эструса выявлен специфический паттерн активации. При экспозиции самки близкородственного вида активация отсутствовала (Вознесенская и др., 2010). Эти различия, по-видимому, могут объясняться неодинаковым химическим составом, т. е. видоспецифичностью феромонов и/или феромональных смесей, выделяемых рецептивными самками. Экспозиция самцам подстилки самки в эструсе как своего, так и другого вида вызывала активацию нейронов основной обонятельной луковицы (ОЛ) как в слое гломерул, так и в слое митральных клеток. В ответ на экспозицию подстилки эстральной самки-конспецифика у самцов трех видов (*M. musculus*, *M. spicilegus* и *M. domesticus*) регистрировался четкий паттерн активации в каудальной части дополнительной ОЛ (Вознесенская и др., 2010) – в области проекций от базальной зоны ВНО, где экспрессируются рецепторы, предположительно участвующие в восприятии соединений с высокой молекулярной массой (Rodrigues et al., 1999). Запах эстральной самки другого вида не вызывал активации как на уровне рецепторной ткани, так и на уровне соответствующей проекционной зоны дополнительной ОЛ. Таким образом, первичный сенсорный анализ биологической значимости сигнала протекает у симпатрических видов мышей на уровне рецепторной ткани ВНО (Вознесенская и др., 2010). Эти данные наряду с найденными существенными различиями химического состава мочи *M. domesticus* и *M. spicilegus* (Soini et al., 2009) подтверждают ранее высказанную точку зрения, согласно которой системы ольфакторной комму-

никации двух филогенетических групп (синантропных и экзоантропных видов домовых мышей) существенно различаются (Котенкова, Амбарян, 2003).

Одним из химически идентифицированных феромонов домовых мышей является гептанон-2 – метаболит надпочечников, обнаруженный в моче лабораторных мышей синантропных видов *M. musculus* и *M. domesticus* (Novotny et al., 1986; Mucignat-Caretta et al., 2010) и вызывающий удлинение продолжительности эструсовых циклов у самок лабораторных мышей (Jemiolo et al., 1989). Это вещество обнаружено в моче интактных (не кастрированных) самцов *M. spicilegus* в низкой концентрации (Soini et al., 2009). Несет ли это соединение функцию феромона не только у лабораторных линий мышей, но и у *M. spicilegus* и *M. musculus*, не известно (Котенкова, 2014). Мы экспонировали *M. spicilegus* и *M. musculus* к гептанону-2, чтобы сравнить активацию нейронов основной и дополнительной ОЛ в ответ на это соединение. Наличие активации в дополнительной ОЛ может служить косвенным указанием на феромональную функцию данного соединения у этих видов.

В работе мы использовали один из методов функциональной томографии – марганец-усиленную магнитно-резонансную томографию (МУ МРТ) для исследования активности ольфакторных нейронов самцов *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* в ответ на экспозицию запаха мочи самок кон- и гетероспецификов. Метод МУ МРТ основан на свойствах ионов Mn^{2+} , которые являются агонистами потенциал-зависимых кальциевых каналов и способны проникать через них внутрь клетки (Aoki et al., 2004). Поскольку марганец относится к парамагнетикам, с помощью МРТ возможно оценивать его накопление в исследуемой ткани. Показано, что уровень активности клеток ткани в ответ на стимул будет прямо пропорционален уровню МРТ-сигнала, который зависит от степени активности кальциевых каналов (Koretsky, Silva, 2004). Задачи данной работы состояли, во-первых, в выявлении у самцов двух видов мышей наличия (отсутствия) предпочтения запаха мочи конспецифичных самок по сравнению с гетероспецифичными в состоянии эструса; во-вторых, в изучении особенностей активации нейронов в основной и дополнительной ОЛ у этих видов мышей в ответ на кон- и гетероспецифические обонятельные сигналы самок в состоянии эструса и гептанон-2.

Материалы и методы

Подопытные животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН и на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН) с использованием коллекции животных ЦКП «Живая коллекция диких видов млекопитающих» ИПЭЭ РАН. В поведенческих опытах использовано семь самцов *M. m. wagneri* F₂₋₄ лабораторного разведения от особей, отловленных в Астраханской области, и 12 самцов *M. spicilegus* лабораторного разведения F₁ от зверьков, отловленных в Ростовской области, в возрасте 4–6 мес. Эксперименты с использованием МУ МРТ проводили на самцах мышей в возрасте 4–8 мес. с массой тела 28–32 г.

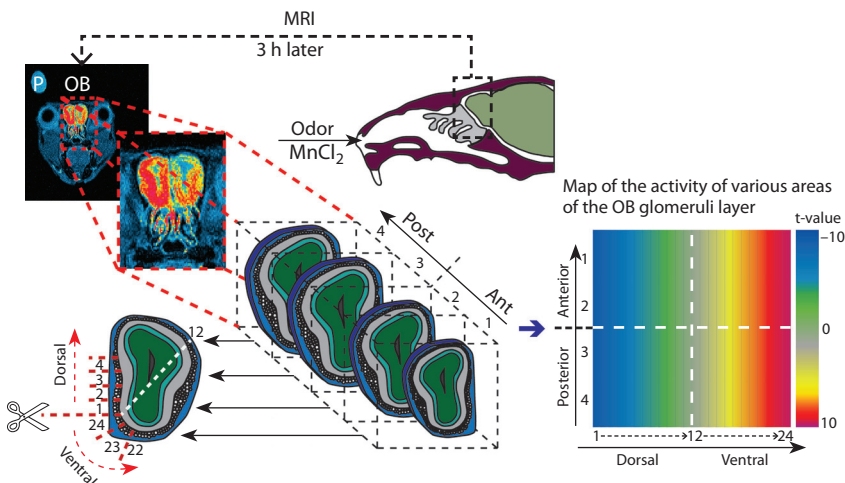


Fig. 1. Processing of MEMRI scans and mapping of the activity of various areas of the mouse OB glomeruli layer in response to the olfactory stimulus.

В опытах использовано 15 самцов *M. m. wagneri*, F₂₋₄ лабораторного разведения от зверьков, отловленных в Астраханской области, и 15 самцов *M. spicilegus*, отловленных при раскопке курганчиков в Ростовской области. За пять дней до начала экспериментов самцов рассаживали по одному в стандартные пластиковые ванночки (25 × 20 × 15 см), а за один час до начала исследования – в стандартные индивидуальные клетки (35 × 25 × 12 см) в вентилируемом помещении при температуре 22–24 °С. Брикетированный корм («Чара», Павловский Посад) и воду мыши получали *ad libitum*. Подстилочным материалом служили обеспыленные древесные опилки.

В качестве запаховых стимулов использовали мочу самок в состоянии эструса. Донорами мочи были половозрелые, не знакомые экспериментальным самцам самки, которых содержали группами по три-четыре особи. Эструс вызывали искусственно последовательными инъекциями 0.06 мл 0.1 % масляного раствора синестрола, а затем через 36–48 ч – 0.06 мл 0.1 % раствора прогестерона. Самцам предъявляли мочу, слитую от четырех-пяти самок. Мочу собирали в пробирки Эппендорфа размером 1.5 мл от доноров при взятии их в руки или высаживании в специальные клетки из сетки (12 × 6 × 6). После сбора мочу замораживали. Перед проведением серии опытов мочу размораживали, повторное замораживание и использование мочи не проводили. Стадию полового цикла самок определяли по влажностным мазкам, взятым перед сбором мочи (Киришенблат, 1971).

Поведенческие опыты. Применяли методику парного предъявления запахов мочи в чашках Петри, подробно описанную в предыдущих публикациях (Соколов и др., 1983; Kotenkova, Naidenko, 1999). Кратко она заключалась в следующем. За пять дней перед проведением экспериментов зверьков рассаживали поодиночке в стеклянные камеры (30 × 20 × 20 см) с сетчатой крышкой. Опыты проводили в этих же камерах с периодичностью один раз в четыре-семь дней при слабом искусственном освещении в период максимальной вечерней активности животных – с 20 до 23 ч. В один конец камеры помещали круглую пластмассовую подставку диаметром 130 мм и высотой 30.5 мм, на нее ставили две чашки Петри диаметром 40 мм. Перед началом опыта в каждую из них наносили мочу доноров (20 мкл), затем ставили на подставку на расстоянии примерно 30 мм друг от друга. С помощью секундомера в течение 5 мин фиксировали время обнюхивания каждого источника запаха после естественного пробуждения зверька, первого подхода и обнюхивания одного из запахов. (Наблюдатель не знал, моча каких особей находилась в чашках Петри во время опыта.)

Опыты с использованием магнитно-резонансной томографии. Проведены серии экспериментов, в которых самцам экспонировали запах мочи са-

мок в следующих сочетаниях: самцам *M. spicilegus* – самок *M. spicilegus*; самцам *M. spicilegus* – самок *M. m. wagneri*; самцам *M. m. wagneri* – самок *M. m. wagneri*; самцам *M. m. wagneri* – самок *M. spicilegus*; контрольные опыты с самцами *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* (без экспозиции запахов). В каждой серии использовано по пять самцов. Кроме того, четырем самцам *M. spicilegus* и четырем самцам *M. m. wagneri* после перерыва в 10 сут экспонировали гептанон-2 при разведении 1:10 (Sigma Aldrich, США).

При исследовании накопления марганца в ОЛ ненаркотизированным животным вводили по 10 мкл 0.01M раствора MnCl₂ в одну ноздрю. Каждое животное поочередно помещали обратно в клетку, на стенке которой была прикреплена пробирка с запаховым стимулом (12 мкл мочи). Экспозиция запахового стимула продолжалась в течение 20 мин, после чего пробирку убрали из клетки с животным. МРТ-сканирование ОЛ проводили через 3 ч после интраназальной аппликации марганца. Накопление Mn²⁺ в ОЛ оценивали с помощью T1-взвешенных МРТ-изображений. Подобные временные рамки были выбраны на основе предварительных экспериментов и данных литературы (Chuang et al., 2009), ввиду того, что через 3 ч паттерны накопления Mn²⁺ в ОЛ в ответ на запаховый стимул наиболее ярко выражены. Томографические исследования проводили по ранее разработанному протоколу, подробно описанному в работе (Ромашченко и др., 2017). Накопление ионов марганца в клетках ОЛ выражали как отношение уровня МРТ-сигнала в исследуемых структурах к уровню МРТ-сигнала в референсе, которым служила микропробирка с фосфатным буфером (0.5 мл), помещенная вдоль головы мыши. Предварительную обработку МРТ-сканов проводили в программе ImageJ, состоящей из нескольких этапов: выравнивание изображений по горизонтали, выделение границ мозга мыши, изменение размеров изображения. Выравнивание геометрии и размеров мозга позволило проводить автоматическое сравнение уровня МРТ-сигнала в дополнительной ОЛ и в отдельных областях основной ОЛ у разных осо-

бей. Для проведения анализа полученных результатов глобулярный слой обонятельных лукович на каждом срезе был условно разделен на 25 областей (рис. 1).

Таким образом, исходное разрешение МРТ-скана было уменьшено до 250 мкм × 250 мкм × 0.5 мм. В пределах этих 25 областей уровень МРТ-сигнала усреднялся, после чего проводили различные межгрупповые сравнения и, таким образом, оценивали изменения нейрональной активности в ответ на запаховый стимул. Для визуализации полученных результатов использовали двухмерную «карту» ольфакторной луковичи, где по оси абсцисс располагали номер области (1–25), а по оси ординат – номер среза (1–4), с помощью псевдоокрашивания кодировали значение *t*-критерия Стьюдента, характеризующего достоверность отличий двух групп (см. рис. 1).

Статистическую обработку данных поведенческих экспериментов проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона в пакете программ STATISTICA 6.0 и критерия знаков.

При обработке данных томографирования для сравнения двух средних использовали *t*-тест Стьюдента. Для множественных сравнений средних использовали LSD-тест (Least Significant Difference). Для оценки взаимозависимостей исследуемых признаков использовали параметрический коэффициент корреляции Пирсона. Сравнение паттернов активации при предъявлении различных запаховых стимулов проводили с помощью иерархической кластеризации (Chuang et al., 2009). Данные выражали как средние ± SE.

Результаты

Самцы двух видов мышей достоверно дольше исследовали запах самок своего вида в состоянии эструса по сравнению с запахом самок близкородственного вида. Самцы *wagneri* в 11 из 13 опытов дольше исследовали запах мочи самок-конспецификов по сравнению с самками *spicilegus*, различия достоверны по критерию знаков, $p = 0.05$; время исследования самок-конспецификов в секундах было (среднее/мин/макс): 9.1/1.3/23.1; гетероспецификов – 3.3/1.1/7.3, $p < 0.01$ по критерию Вилкоксона. Самцы *spicilegus* в 11 из 15 опытов дольше исследовали запах мочи самок-конспецификов по сравнению с самками *wagneri*, различия достоверны по критерию знаков, $p = 0.01$; время исследования самок-конспецификов 15.4/0.8/32.8, гетероспецификов 2.0/0.3/6.1, $p < 0.001$.

Активность нейронов обонятельного эпителия и ВНО самцов *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* оценивали, исходя из уровня МРТ-сигнала в глобулярном слое основной ОЛ и в нейронах дополнительной ОЛ (рис. 2, а).

При предъявлении самцам *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* запаха конспецифичной самки по сравнению с самцами контрольной группы наблюдалось достоверное увеличение накопления Mn^{2+} в дорсальном отделе задней части ОЛ, а при экспозиции запаха гетероспецифичной самки – в дорсальной области передней части ОЛ. Экспонирование к запаху гептанона-2 приводило не только к увеличению накопления контраста в определенных зонах, но и к значительному снижению накопления Mn^{2+} в остальной части ОЛ (см. рис. 2, а). У самцов *M. spicilegus* предъявление гептанона-2 вызывало увеличение накопления

МРТ-контраста в вентральной области задней части ОЛ, у *M. m. wagneri* – в дорсальной области ОЛ (см. рис. 2, а). На рис. 2, б приведены тепловые карты накопления ионов марганца в ОЛ при сравнении ответов на запаховые стимулы между собой. Анализ накопления Mn^{2+} в дополнительной ОЛ показал, что у обоих видов наибольший ответ клеток ВНО вызывало предъявление в качестве запахового стимула гептанона-2 (рис. 3).

У самцов *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* наблюдалось достоверное увеличение накопления МРТ-контраста в дополнительной ОЛ только в случае предъявления запаха мочи самок конспецифичного вида (см. рис. 3).

Обсуждение

Как уже отмечалось выше, представители симпатрических форм *M. m. musculus* и *M. spicilegus* достоверно дольше исследуют запах особей своего вида (Соколов и др., 1983). Реакция самцов аллопатрически распространенных *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* была сходной, т. е. они достоверно дольше исследовали запах конспецифичных самок в состоянии эструса по сравнению с гетероспецифичными. Таким образом, не выявлено какой-либо разницы в поведенческой реакции на кон- и гетероспецифические запахи самок у самцов, симпатричных и аллопатричных с *M. spicilegus* форм *M. musculus*.

С помощью метода МУ МРТ нами охарактеризована реакция основного обонятельного эпителия и нейронов ВНО самцов *M. spicilegus* и *M. m. wagneri* на запах мочи кон- и гетероспецифичных самок, а также гептанона-2 высокой концентрации. Как отмечалось ранее, гептанон-2 – феромон, вызывающий удлинение продолжительности эструсовых циклов у самок лабораторных мышей (Jemiolo et al., 1989). Распознавание этого пахучего вещества осуществляется рецепторами как ВНО, так и обонятельного эпителия (Leinders-Zufall et al., 2000; Хохлов и др., 2009). У двух исследованных нами видов мышей достоверная реакция дополнительной обонятельной системы наблюдалась только при предъявлении запаха конспецифичной самки. Это соответствует ранее полученным данным при использовании другого подвида *M. m. musculus* методом иммуногистохимического окрашивания с применением первичных антител против белка Fos (Вознесенская и др., 2010). Активация основной ОЛ в ответ на запах мочи кон- и гетероспецифичных самок оказалась гораздо менее выражена, чем на гептанон-2, как у самцов *M. spicilegus*, так и у самцов *M. m. wagneri*. Результаты по нейрональной активации в основной ОЛ самцов при экспозиции им запаха кон- и гетероспецифичных самок в состоянии эструса несколько отличаются от ранее полученных методом иммуногистохимического окрашивания. При использовании в экспериментах синантропных видов мышей *M. m. musculus* и *M. domesticus* (лабораторные мыши) и экзоантропного вида *M. spicilegus* при экспонировании подстилки самок в состоянии эструса как своего, так и другого вида прослеживалась четкая активация в ростральной и каудальной частях основной ОЛ (Вознесенская и др., 2010). В наших экспериментах мы наблюдали у самцов *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* локальное увеличение накопления контраста в дорсальной области передней части ОЛ в ответ на предъявление запаха гетероспеци-

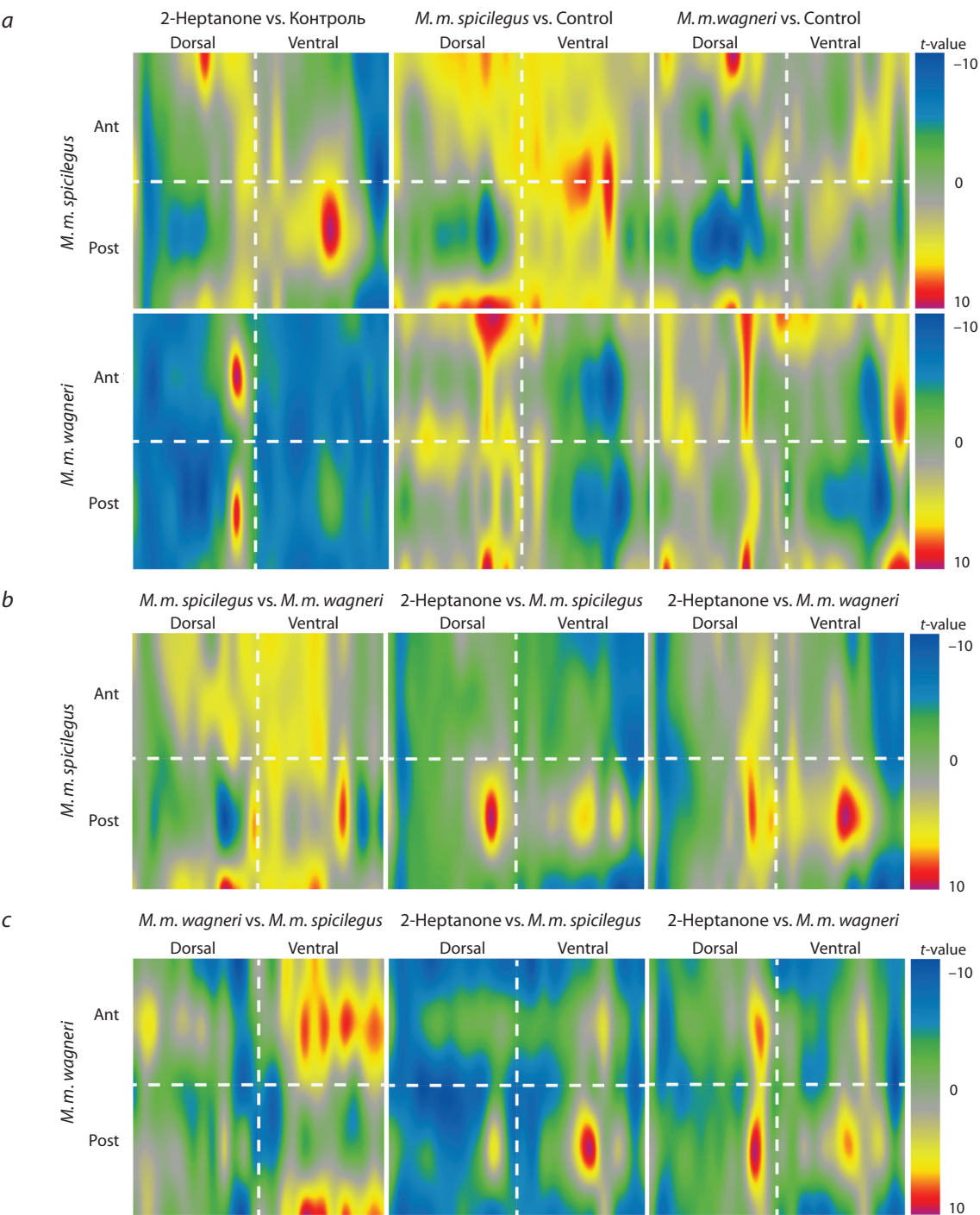


Fig. 2. Accumulation of manganese ions in various areas of the main OB in *M. spicilegus* and *M. m. wagneri* males in response to the presentation of the odor of a con-/heterospecific female or 2-heptanone. Pseudocoloring illustrates the significance of the increase ($t > 0$, where t is Student's t criterion in pixel-to-pixel comparison of the group mean values of the signal in mouse OB) or decrease ($t < 0$) of the intensity of contrast accumulation in various OB areas in response to the olfactory stimulus in comparison with (a) the control group not presented the odor or (b, c) the response to another olfactory stimulus.

фика и в дорсальной области задней (каудальной) части ОЛ при экспозиции запаха мочи конспецифика. В данном исследовании у самцов паттерны накопления контраста в основной ОЛ при предъявлении мочи кон- и гетероспецифичных самок достоверно коррелируют. Различия результатов могут быть обусловлены разницей химического состава мочи у *M. m. wagneri* и *M. m. musculus*.

Таким образом, с одной стороны, с помощью МУ МРТ удалось продемонстрировать специфичность ответа дополнительной обонятельной системы на запах мочи конспецифика противоположного пола, что соответствует ранее полученным данным. С другой стороны, с помощью этого метода нам удалось показать локализацию ответа на запахи кон- и гетероспецификов в области основной ОЛ,

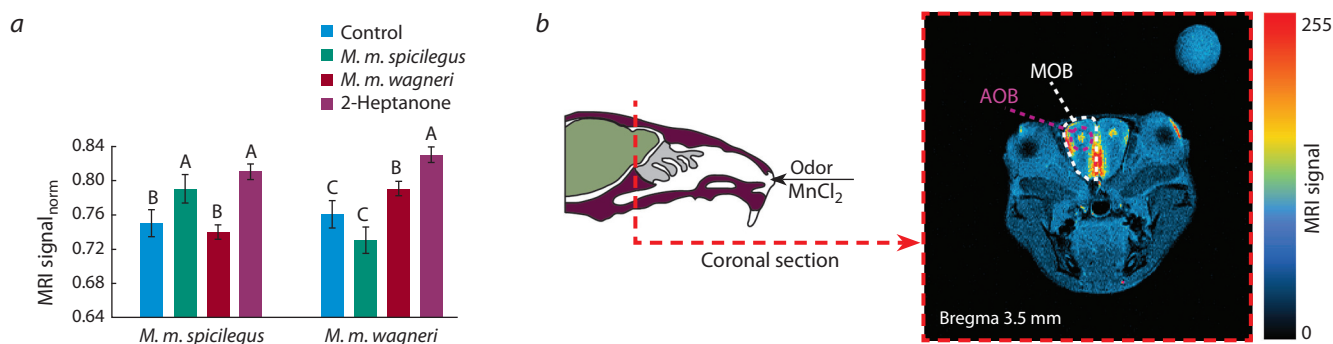


Fig. 3. Activation of neurons in the accessory OB in *M. spicilegus* and *M. m. wagneri* males in response to the presentation of the odor of a con-/heterospecific female or 2-heptanone.

(a) The response of OB neurons to an olfactory stimulus is assessed from the intensity of Mn(II) accumulation, directly correlating with the level of the MRI signal in the area. (b) T1-weighted image of the accumulation of the MRI contrast in OB in response to an olfactory stimulus. Designations: AOB, accessory OB; MOB, main OB; A, B, C, significance of differences between mean values (LSD test, $p < 0.05$).

реагирующей на наиболее значимые социальные стимулы, такие как запах хищника и запах корма (Bolon et al., 1991; Kobayakawa et al., 2007). Следует отметить, что довольно долго считалось, что вомероназальная система в эволюционном плане сформировалась как специализированная для восприятия социально значимых для животных сигналов – феромонов и феромональных смесей (Wysocki, 1979; Liman, 1996). Это подтверждается и тем фактом, что все известные на сегодняшний день феромоны домовых мышей воспринимаются дополнительной обонятельной системой (Tirindelli et al., 2009; Котенкова, 2014). Однако результаты исследований последних лет показали, что провести столь четкое разделение функций невозможно, а основная и дополнительная обонятельные системы, скорее, дополняют друг друга при распознавании разных сигналов (Kelliher, 2007; Tirindelli et al., 2009; Baum, 2012). Выявлена активация в гломерулярном слое основной ОЛ мышей и крыс при экспозиции соединений, описанных ранее как феромоны мышей (Хохлов и др., 2009; Johnson et al., 2009). В связи с этим полученные нами данные о разной локализации нейронных ответов на кон- и гетероспецифические обонятельные сигналы, связанные с размножением как в основной, так и дополнительной обонятельной системах, представляют особый интерес и открывают дальнейшие перспективы для изучения данной проблемы.

В настоящее время опубликованы результаты ряда исследований, посвященных картированию пространственного представительства рецепторов, воспринимающих разные одоранты, в ОЛ (Mori et al., 2006; Johnson et al., 2009), в том числе полученные с помощью метода функциональной томографии (Xu et al., 2003; Schafer et al., 2006). Одна из задач такого картирования – выявление видоспецифичности хемотопической организации (chemotopic organization) ОЛ. При этом исследования, выполненные на лабораторных мышах и крысах, показали наличие различий между этими видами (Johnson et al., 2009), которые, с точки зрения зоолога-эволюциониста, сложно назвать близкородственными. В нашем исследовании выявлены различия в ответ на экспозицию к гептанону-2 у двух действительно близкородственных видов мышей. Как уже отмечалось выше, у самцов *M. spicilegus* предъ-

явление гептанона-2 вызывало увеличение накопления МРТ-контраста в вентральной области задней части ОЛ, у *M. m. wagneri* – в дорсальной области ОЛ. Ранее у мышей C57BL/6J, линии, генетически близкой к *M. domesticus*, показана активация в дорсально расположенных гломерулах в ответ на гептанон-2 высокой концентрации (Johnson et al., 2009), что совпадает с полученными нами данными для *M. m. wagneri*. Поскольку запах гептанона-2 вызывал активацию нейронов как основной, так и дополнительной ОЛ, возможно, что это соединение несет феромональные функции и у исследованных нами видов. Это предположение, безусловно, нуждается в экспериментальной проверке.

Закключение

Полученные результаты подтверждают высказанное ранее на основании данных изучения поведенческих ответов на кон- и гетероспецифические запахи предположение о существенной разнице систем химической коммуникации у двух симпатрических видов мышей (Котенкова, Амбарян, 2003). При сопоставлении результатов этого исследования с ранее полученными не выявлено различий в поведенческих и нейронных реакциях у аллопатрически (*M. m. wagneri*) и симпатрически (*M. m. musculus*) распространенных с *M. spicilegus* подвидов домовой мыши. Это не позволяет предполагать действие в процессе эволюции механизма «усиления» при формировании прекопуляционной репродуктивной изоляции между симпатрическими видами *M. spicilegus* и *M. musculus*. Повидимому, выявленные существенные различия систем химической коммуникации этих видов сформировались в условиях аллопатрии, еще до того, как эти виды стали симпатрическими.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-10269. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aoki I., Wu Y.J.L., Silva A.C., Lynch R.M., Koretsky A.P. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage*. 2004;22(3):1046-1059.
- Baum M.J. Contribution of pheromones processed by the main olfactory system to mate recognition in female mammals. *Front. Neuroanat.* 2012;6(20). DOI 10.3389/fnana.2012.00020.
- Bolon B., Bonnefoi M.S., Roberts K.C., Marshall M.W., Morgan K.T. Toxic interactions in the rat nose: pollutants from soiled bedding and methyl bromide. *Toxicol. Pathol.* 1991;19(4):571-579.
- Christophe N., Baudoin C. Olfactory preferences in two strains of wild mice, *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*, and their hybrids. *Anim. Behav.* 1998;56(2):365-369.
- Chuang K.H., Lee J.H., Silva A.C., Belluscio L., Koretsky A.P. Manganese enhanced MRI reveals functional circuitry in response to odorant stimuli. *Neuroimage*. 2009;44(2):363-372.
- Doty R.L. *The Great Pheromone Myth*. Baltimore MD: Johns Hopkins University Press, 2010.
- Heth G., Todrank J., Busquet N., Baudoin C. Odour-genes covariance and differential investigation of individual odours in the *Mus* species complex. *Biol. J. Linn. Soc.* 2001;73(2):213-220.
- Jemiolo B., Andreolini F., Xie T.M., Wiesler D., Novotny M. Puberty-affecting synthetic analogs of urinary chemosignals in the house mouse, *Mus domesticus*. *Physiol. Behav.* 1989;46(2):293-298.
- Johnson B.A., Xu Z., Ali S.S., Leon M. Spatial representations of odorants in olfactory bulbs of rats and mice: similarities and differences in chemotopic organization. *J. Comp. Neural.* 2009;514(6):658-673.
- Kelliher K.R. The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Horm. Behav.* 2007;52(5):561-570.
- Khokhlov A.A., Romanov R.A., Rogachevskaya O.A., Sadovnikov V.B., Kolesnikov S.S. A possible role of gustducin-positive sensory cells operative in the main olfactory epithelium in the recognition of 2-heptanone. *Sensornye sistemy = Sensory Systems*. 2009;23(2):164-171. (in Russian)
- Kirshenblat Ya.D. *Osnovy endokrinologii [Fundamentals of Endocrinology]*. M., 1971. (in Russian)
- Kobayakawa K., Kobayakawa R., Matsumoto H., Oka Y., Imai T., Ikawa M., Okabe M., Ikeda T., Itohara S., Kikusui T. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature*. 2007;450(7169):503-508.
- Koretsky A.P., Silva A.C. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed.* 2004;17(8):527-531.
- Kotenkova E.V. A comparative analysis of ethological and physiological mechanisms of precopulatory reproductive isolation in rodents. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Current Biology*. 2014;135(5):488-518. (in Russian)
- Kotenkova E.V., Ambaryan A.V. Ethological mechanisms of reproductive isolation in house mice of *Mus musculus* s. l. superspecies complex. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Current Biology*. 2003;123(6):599-608. (in Russian)
- Kotenkova E.V., Maltsev A.N., Ambaryan A.V. Influence of early olfactory experience on mate choice in mammals: Evolutionary aspects. *Zhurnal obshchey biologii = Journal of General Biology*. 2017;78(4):21-39. (in Russian)
- Kotenkova E.V., Naidenko S.V. Discrimination of con- and heterospecific odors in different taxa of the *Mus musculus* species group: Olfactory cues as precopulatory isolating mechanism. Eds R.E. Johnston, D. Müller-Schwarze, P.N.Y. Sorensen. *Advances Chemical Communication Vertebrates*. N. Y: Plenum Press, 1999;299-308.
- Leinders-Zufall T., Lane A.P., Puche A.C., Ma W., Novotny M.V., Shipley M.T., Zufall F. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*. 2000;405(6812):792-796.
- Liman E.R. Pheromone transduction in the vomeronasal organ. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996;6(4):487-493.
- Mori K., Takahashi Y.K., Igarashi K.M., Yamaguchi M. Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev.* 2006;86(2):409-433.
- Mucignat-Caretta C., Redaelli M.L., Orsetti A., Perriat-Sanguinet M., Zagotto G. Urinary volatile molecules vary in males of the two European subspecies of the house mouse and their hybrids. *Chem. Senses*. 2010;35(8):647-654.
- Novotny M., Jemiolo B., Harvey S., Wiesler D., Marchlewska-Koj A. Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science*. 1986;231(4739):722-725.
- Rodriguez I., Feinstein P., Mombaerts P. Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell*. 1999;97(2):199-208.
- Romashchenko A.V., Petrovsky D.V., Moshkin M.P. The congruence between intra-nasal aerodynamics and functional heterogeneity of olfactory epithelium. *Zhurnal obshchey biologii = Journal of General Biology*. 2017;78(1):15-24. (in Russian)
- Schafer J.R., Kida I., Xu F., Rothman D.L., Hyder F. Reproducibility of odor maps by fMRI in rodents. *Neuroimage*. 2006;31(3):1238-1246.
- Smadja C., Ganem G. Divergence of odorant signals within and between the two European subspecies of the house mice. *Behav. Ecol.* 2008;19(1):223-230.
- Soini H.A., Wiesler D., Koyama S., Féron C., Baudoin C., Novotny M.V. Comparison of urinary scents of two related mouse species, *Mus spicilegus* and *Mus domesticus*. *J. Chem. Ecol.* 2009;35(5):580-589.
- Sokolov V.E., Kotenkova E.V., Lyalukhina S.I. *Biologiya domovoy i kurganchikovoy myshey [Biology of House and Mound-building Mice]*. M., 1990. (in Russian)
- Sokolov V.E., Lyalukhina S.I., Kotenkova E.V. Comparative study of the response to olfactory signals of house and mound-building mice (Rodentia, Muridae). *Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 1983;62(9):1394-1398. (in Russian)
- Surov A.V., Maltsev A.N. Analysis of chemical communication in mammals: Zoological and ecological aspects. *Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 2016;95(12):1449-1458. DOI 10.7868/S0044513416120175. (in Russian)
- Tirindelli R., Dibattista M., Pifferi S., Menini A. From pheromones to behaviour. *Physiol. Rev.* 2009;89(3):921-956.
- Voznesenskaya A.E., Ambaryan A.V., Klyuchnikova M.A., Kotenkova E.V., Voznesenskaya V.V. Mechanisms of reproductive isolation in house mouse superspecies complex *Mus musculus* s. lato: from behaviour to receptors. *Doklady Biological Sciences*. 2010;435(1):418-420. DOI 10.1134/S001249661006013X.
- Wysocki C.J. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1979;3(4):301-341.
- Xu F., Liu N., Kida I., Rothman D.L., Hyder F., Shepherd G.M. Odor maps of aldehydes and esters revealed by functional MRI in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(19):11029-11034.



Особенности распределения электролитов в различных тканях у миниатюрных свиней

А.В. Фатьянова^{1, 2}✉, В.А. Лавриненко¹, О.В. Трапезов^{1, 2}, Н.С. Юдин^{1, 2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Использование миниатюрных свиней в качестве биологических моделей основывается на большом сходстве их анатомии и физиологии сердечно-сосудистой системы, морфологии и физиологии кожи, органов пищеварения в сравнении с человеком и способствует решению проблем ксенотрансплантации. Однако, несмотря на широкий интерес к данной породе животных, остаются малоизученными особенности распределения воды и электролитов в тканях мини-свиней, что явилось целью настоящего исследования. Изучено распределение катионов натрия, калия и воды в скелетных мышцах, миокарде, гладкомышечных элементах сосудистой системы, печени и коже мини-свиней, различающихся по полу и поведенческой реакции по отношению к человеку. Количественное содержание катионов натрия и калия определяли методом атомно-адсорбционной спектроскопии. Показано, что скелетные и гладкие мышцы отличаются по электролитному составу. При этом в скелетных мышцах выявлена зависимость содержания электролитов от типа поведения по отношению к человеку. Полученные данные подтверждаются и двухфакторным дисперсионным анализом. Обнаружено накопление воды в образцах мышечной ткани ручных самцов по сравнению с трусливыми, что также доказывается результатами исследования дисперсионного комплекса. Изучение распределения электролитов в коже свидетельствует о влиянии типа поведения на содержание натрия. Пол животных и тип поведения не повлияли на распределение калия и массовую долю воды в коже и печени исследованных животных. В ходе работы не выявлено влияния пола и типа поведения животных на содержание натрия в печени, однако обнаружено значительное содержание калия по сравнению с натрием, что, возможно, связано с высокой плотностью клеточных элементов. Установлены некоторые различия распределения основных катионов внеклеточного и внутриклеточного секторов, а также зависимость содержания электролитов от функциональных особенностей тканей. Полученные данные демонстрируют, что мини-свиньи ИЦиГ могут являться информативной моделью для исследования влияния генетических (пол) и фенотипических (тип поведения) особенностей на параметры водно-электролитного гомеостаза.

Ключевые слова: мини-свиньи; атомно-адсорбционная спектроскопия; натрий; калий; образцы тканей.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Фатьянова А.В., Лавриненко В.А., Трапезов О.В., Юдин Н.С. Особенности распределения электролитов в различных тканях у миниатюрных свиней. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):795-797. DOI 10.18699/VJ17.295

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Fatianova A.V., Lavrinenko V.A., Trapezov O.V., Yudin N.S. Features of the electrolyte distribution in various tissues in miniature pigs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):795-797. DOI 10.18699/VJ17.295 (in Russian)

Features of the electrolyte distribution in various tissues in miniature pigs

A.V. Fatianova^{1, 2}✉, V.A. Lavrinenko¹,
O.V. Trapezov^{1, 2}, N.S. Yudin^{1, 2}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Striking similarities between human and miniature pig anatomy and physiology of the cardiovascular system, skin and digestive organs have made miniature pigs a successful animal model for addressing problems of xenotransplantation. However, despite the widespread interest in this breed of animals, the distribution of water and electrolytes in the tissues of miniature pigs remains poorly understood, which led us to conduct this study. The distribution of sodium, potassium cations and water in skeletal muscles, myocardium, smooth muscle elements of the vascular system, liver and skin of mini-pigs differing in gender and behavioral response to humans has been studied. Quantitative determination of sodium and potassium cations was performed by atomic absorption spectroscopy. It was shown that skeletal and smooth muscles differ in electrolyte content. The impact of behavioral response to humans on the electrolyte level in skeletal muscle was detected. The data are confirmed by two-factor dispersion analysis. The accumulation of water in muscle samples of "tame" males as compared with cowardly animals was shown. The impact of different behavioral types on the amount of sodium in the skin was revealed. The impact of the gender of animals or the type of behavior on the sodium level in the liver was not detected. However, a significant amount of potassium was found in the liver as compared with sodium level, which is possibly associated with a high density of cellular elements. The gender and behavioral type of animals did not have an impact on the distribution of potassium and the mass fraction of water in the skin and liver. Some differences in the distribution of the main extracellular and intracellular sectors' cations were revealed, and so was the dependence of the electrolyte content on the functional characteristics of the tissues. The data obtained demonstrate that miniature pigs can be an informative animal model for studying the influence of genetic (gender) and phenotypic (behavioral response) aspects on the parameters of water-electrolyte homeostasis.

Key words: miniature pigs; atomic absorption spectroscopy; sodium; potassium; tissue samples.

В настоящее время за рубежом и в России широко внедряются в практику медико-биологических исследований миниатюрные свиньи как новый вид лабораторных животных (Morisson et al., 2000; Никитин и др., 2014). Многие системы мини-свиней (сердечно-сосудистая, пищеварительная, кожа) имеют значительное анатомическое и физиологическое сходство с системами человека, что позволяет использовать этот вид в качестве биологической модели, а также в процессах ксенотрансплантации (Капанадзе, 2006; Айтназаров и др., 2014).

Для медико-биологических целей впервые в Российской Федерации в ИЦиГ СО РАН выведена порода мини-свиней путем отдаленной гибридизации и сложным воспроизводительным скрещиванием домашних и диких свиней европейского и азиатского происхождения (Тихонов, 2010). Несмотря на активное изучение данной породы животных, особенности локализации воды и электролитов в тканях мини-свиней остаются малоизученными, что послужило целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Работа выполнена на 40 миниатюрных свиньях в возрасте 1 мес., массой 8–12 кг, полученных из питомника ИЦиГ СО РАН. Животные были разделены на четыре группы по полу и реакции поведения по отношению к человеку (трусливо-оборонительная и ручная). Исследование проведено с соблюдением Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Для анализа содержания электролитов были отобраны образцы мышечной ткани (скелетная бедренная мышца, сердечная мышца (миокард левого желудочка), аорта, полая вена), а также кожи и печени. Кусочки ткани высушивали до постоянной массы при температуре 100 °С. Количественное содержание катионов натрия и калия определяли методом атомно-адсорбционной спектроскопии (Hitachi Z-8000, Япония). Массовую долю воды рассчитывали как отношение массы воды к массе образца во влажном состоянии.

Достоверность различий показателей между группами животных оценивали в пакете программ Statistica 8.0 с использованием теста Дункана и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, где в качестве независимых переменных взяты пол животного и реакция поведения на человека.

Результаты и обсуждение

Известно, что натрий является основным внеклеточным катионом и обеспечивает, наряду с участием в поддержании водно-солевого гомеостаза, а также процессов трансмембранного транспорта, процесс возбуждения в нервных и мышечных клетках (Nehrke, 2014). В табл. 1 представлены данные о распределении катионов натрия в образцах ткани, в зависимости от пола животных и типа поведения по отношению к человеку. Сравнение разных типов мышечной ткани показало, что в гладкомышечных элементах сосудистого русла (аорта и полая вена) натрия содержится больше, чем в миокарде. Меньше всего натрия определяется в скелетной мышце. В скелетных мышцах ручных самцов выявлено достоверно более высокое содержание натрия по сравнению с самцами с трусливой реакцией

поведения ($p < 0.05$). У экспериментальных животных женского генотипа с ручным типом поведения обнаружено достоверное уменьшение содержания натрия в миокарде по сравнению с трусливыми особями ($p < 0.05$). Также в миокарде трусливых самок выявляется повышенное содержание натрия по сравнению с трусливыми самцами ($p < 0.05$). Дисперсионный анализ полученных данных показал достоверное влияние типа поведения на содержание натрия в аорте ($F_{1,36} = 6.21, p < 0.05$). В остальных экспериментальных группах достоверного влияния факторов пола, типа поведения и их взаимодействия не обнаружено.

Основной путь поступления воды и электролитов в организм – желудочно-кишечный тракт. Кровь, оттекающая от тонкой кишки, поступает в печень, одной из важных функций которой является участие в минеральном обмене. Для поддержания водно-солевого гомеостаза важны не только пути поступления воды и электролитов, но и размеры потерь, основную роль в этом играет кожа. Размеры потерь воды через кожу определяются скоростью диффузии через заполненный липидами ороговевший протекторный слой (Иванова, 2009). Анализ двухфакторного дисперсионного комплекса выявил влияние типа поведения на распределение натрия в коже ($F_{1,36} = 11.03, p < 0.01$): наблюдается уменьшение содержания натрия у ручных животных по сравнению с трусливыми (самцы: $p < 0.05$, самки: $p < 0.05$). В ходе исследования не обнаружено эффектов пола и типа поведения животных на содержание натрия в печени.

Важнейшим ионом внутриклеточной жидкости по сравнению с внеклеточной является калий (см. табл. 1). При сравнении разных тканей отмечено преобладание калия в скелетной мышце и миокарде. Выявлено, что в гладкомышечных элементах сосудистой системы самцов содержание калия выше у ручных животных ($p < 0.05$), что подтверждается влиянием фактора типа поведения при анализе дисперсионного комплекса ($F_{1,36} = 5.21, p < 0.05$). В печени обнаружено значительное содержание калия по сравнению с натрием, что, возможно, связано с высокой плотностью клеточных элементов. Пол и тип поведения животных не повлияли на распределение калия в печени и коже исследованных животных.

Натрий и калий, являясь осмотически активными ионами, способствуют перераспределению воды между клеткой и внеклеточной жидкостью. Анализ полученных данных показал накопление воды в скелетных и гладкомышечных образцах ручных самцов по сравнению с трусливыми (табл. 2), что подтверждается результатами дисперсионного анализа: фактор типа поведения достоверно влияет на обводненность аорты ($F_{1,36} = 4.94, p < 0.05$) и поллой вены ($F_{1,36} = 10.27, p < 0.01$). На содержание воды в скелетной мышце оказали влияние фактор пола ($F_{1,36} = 10.00, p < 0.01$) и взаимодействие факторов пола и типа поведения ($F_{1,36} = 14.25, p < 0.001$). Факторы пола и типа поведения не влияют на массовую долю воды в коже и печени.

Анализ результатов исследования позволил выявить некоторые различия распределения основных катионов внеклеточного и внутриклеточного секторов, а также зависимость содержания электролитов от функциональных особенностей тканей.

Table 1. Concentrations of sodium and potassium ions in tissue samples, µg/mg dry tissue, M ± SEM

Tissue	Sodium				Potassium			
	Males		Females		Males		Females	
	cowardly animals	tame animals	cowardly animals	tame animals	cowardly animals	tame animals	cowardly animals	tame animals
Skeletal muscle	2.60±0.11	3.30±0.30*	2.81±0.22	2.80±0.15	12.79±0.27	12.08±1.24	12.76±1.45	14.27±0.86
Cardiac muscle	4.67±0.17	4.34±0.21	7.78±1.67#	4.69±0.32*	12.62±1.05	13.78±0.93	12.22±1.37	13.05±0.78
Aorta	5.84±0.78	8.23±0.92	5.78±0.89	7.53±0.71	3.09±0.37	5.95±1.29*	3.96±0.54	4.66±0.57
Hollow vein	6.62±0.20	7.95±0.91	6.14±0.34	6.65±0.70	4.68±0.12	12.30±4.14*	5.01±0.43	4.99±0.31#
Skin	6.87±0.51	5.44±0.63*	7.10±0.44	5.32±0.29*	4.18±0.47	3.69±0.46	4.16±0.32	4.70±1.45
Liver	2.90±0.07	3.04±0.10	3.06±0.17	3.14±0.12	9.95±0.29	9.71±0.55	10.01±0.21	10.01±0.36

* $p < 0.05$ vs. same-sex cowardly animals; # $p < 0.05$ vs. males of the same behavior type.

Table 2. Percentage of water in tissue samples, M ± SEM

Tissue	Males		Females	
	cowardly animals	tame animals	cowardly animals	tame animals
Skeletal muscle	75.50±0.37	77.64±0.71*	75.84±0.23	73.80±0.73* ###
Cardiac muscle	77.56±0.34	77.72±0.55	77.58±0.27	74.83±1.88
Aorta	57.87±3.59	71.24±2.82*	57.55±4.80	60.12±2.74#
Hollow vein	65.02±0.85	70.77±1.28**	64.90±0.98	66.47±1.38#
Skin	72.40±3.09	66.26±2.27	70.21±1.18	64.62±1.29
Liver	70.25±0.44	71.42±0.62	70.20±0.44	69.51±0.53#

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in comparison to same-sex cowardly animals; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ in comparison to males of the same behavior type.

Полученные данные демонстрируют, что мини-свиньи ИЦиГ могут являться информативной моделью для исследования влияния генетических (пол) и фенотипических (тип поведения) особенностей на параметры водно-электролитного гомеостаза.

Acknowledgments

This work is supported by the Russian Academy of Sciences, projects 0324-2016-0010 and 0324-2016-0002. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aitnazarov R.B., Yudin N.S., Nikitin S.V., Ermolayev V.I., Voevoda M.I. Identification of whole genomes of endogenous retroviruses in Siberian miniature pigs. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(2):294-297. (in Russian)

Ivanova L.N. Regulatsiya vodno-solevogo balansa u cheloveka i zhivotnykh [Regulation of the water-salt balance in humans and animals]. *Izbrannye lektsii po sovremennoy fiziologii*. Pod red. M.A. Ostrovskogo, A.L. Zefirova [M.A. Ostrovsky and A.L. Zefirov (Eds.) Selected lectures on modern physiology]. Kazan: Art-Kafe Publ., 2009;303-326. (in Russian)

Kapanadze G.D. Use of miniature pigs in biomedical experiments. *Biomeditsina* = Biomedicine. 2006;2:40-51. (in Russian)

Morisson S.G., Dominguez J.J., Frascarolo P., Reiz S. A comparison of the electrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized swine. *Anesth. Analg.* 2000;90:1308-1314.

Nehrke K. Membrane ion transport in non-excitable tissues. *Worm-Book*. 2014;23:1-22.

Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S. Miniature pigs of ICG as a model object for morphogenetic research. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(2):279-293. (in Russian)

Tikhonov V.N. Laboratornye mini-svin'i: genetika i mediko-biologicheskoe ispolzovanie [Laboratory Minipigs: Genetics and Biomedical Use]. Novosibirsk: SO RAN Publ., 2010. (in Russian)

Экспрессия генов системы катехоламинов в среднем мозге и реакция престаимпульного торможения у крыс с генетической кататонией

М.А. Рязанова¹✉, О.И. Прокудина¹, В.С. Плеканчук², Т.А. Алехина¹

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

² Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

В Институте цитологии и генетики СО РАН путем селекции на усиление реакции пассивно-оборонительного застывания в ответ на стрессорный стимул создана линия крыс ГК (от слов «генетическая» и «кататония»). Ранее было показано, что крысы линии ГК имеют ряд биохимических и поведенческих особенностей, гомологичных соответствующим характеристикам у больных шизофренией и депрессией. Реакцию престаимпульного торможения (PPI) рассматривают в качестве показателя, снижение которого может свидетельствовать о наличии психопатологии, в частности шизофрении. Исследования показывают, что норадренергическая система мозга влияет на проявление PPI через активацию центральных альфа-адренорецепторов. Известна также связь PPI с экспрессией катехол-О-метилтрансферазы. Целью работы было исследование реакции престаимпульного торможения у крыс инбредной линии ГК как гипотетической модели шизофренической патологии и изучение связи реакции престаимпульного торможения у крыс ГК с экспрессией мРНК генов тирозингидроксилазы, катехол-О-метилтрансферазы, альфа1А- и альфа2А-адренорецепторов в среднем мозге. Впервые выявлено снижение реакции престаимпульного торможения у крыс линии ГК по сравнению с крысами линии WAG при силе престаимула как 75, так и 85 дБ, что может указывать на нарушение процесса фильтрации сенсомоторной информации в ЦНС у крыс линии ГК. Методом ПЦР в реальном времени показано снижение уровня экспрессии мРНК гена *Adra1A* у интактных крыс с ГК по сравнению с контрольными крысами линии WAG. Корреляционных взаимосвязей между экспрессией мРНК генов *Adra1A*, *Adra2A*, *Th*, *Comt* в среднем мозге и реакцией престаимпульного торможения у крыс линии ГК не обнаружено. Сниженная реакция престаимпульного торможения у крыс линии ГК свидетельствует в пользу функционального сходства линии как предполагаемой генетической модели шизофренической психопатологии с прототипом.

Ключевые слова: генетическая кататония; престаимпульное торможение; престаимпульное ингибирование; средний мозг; экспрессия генов; альфа-адренорецепторы; катехол-О-метилтрансфераза; тирозингидроксилаза.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Рязанова М.А., Прокудина О.И., Плеканчук В.С., Алехина Т.А. Экспрессия генов системы катехоламинов в среднем мозге и реакция престаимпульного торможения у крыс с генетической кататонией. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):798-803. DOI 10.18699/VJ17.296

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ryazanova M.A., Prokudina O.I., Plekanchuk V.S., Alekhina T.A. Expression of catecholaminergic genes in the midbrain and prepulse inhibition in rats with a genetic catatonia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):798-803. DOI 10.18699/VJ17.296 (in Russian)

Expression of catecholaminergic genes in the midbrain and prepulse inhibition in rats with a genetic catatonia

M.A. Ryazanova¹✉, O.I. Prokudina¹, V.S. Plekanchuk², T.A. Alekhina¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² The Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia

The GC rat strain (from the words “genetic” and “catatonia”) was created by selection for predisposition to passive-defensive reaction of catatonic freezing in response to stressing stimuli. Rats of the GC strain have previously demonstrated a number of biochemical and behavioral properties similar to those of patients with schizophrenia and depression. Prepulse inhibition (PPI) is widely explored as an important indicator, a decrease of which may be indicative of psychopathology, including schizophrenia. It has been established that the brain noradrenergic system influences the manifestation of PPI, in particular through the activation of central alpha-adrenoreceptors. Also known is the association between PPI and expression of catechol-O-methyltransferase. This study focuses on the reaction of prepulse inhibition in rats of the inbred GC strain, being considered as a hypothetical model of schizophrenia, as well as on the relation of prepulse inhibition to mRNA expression of tyrosine hydroxylase, catechol-O-methyltransferase, alpha1A- and alpha2A-adrenergic receptors in the midbrain of GC rats. For the first time, a decrease of PPI in GC rats compared with WAG rats was shown, both with a prepulse power of 75 dB and at 85 dB, which may indicate a violation of filtration of sensorimotor information into the central nervous system in GC rats. Real-time PCR showed a decrease in mRNA level of *Adra1A* in intact rats with genetic catatonia when compared to control WAG rats. There was observed no correlation between the expression of mRNA of the *Adra1A*, *Adra2A*, *Th*, and *Comt* genes in the midbrain and the PPI reaction in GC rats. The reduction of prepulse inhibition in GC rats indicates functional similarity of this genetic model of schizophrenic psychopathology with a prototype.

Key words: genetic catatonia; prepulse inhibition; midbrain; gene expression; alpha-adrenoreceptors; catechol-O-methyltransferase, tyrosine hydroxylase.

В Институте цитологии и генетики СО РАН была селекционирована линия крыс ГК (аббревиатура от слов «генетическая» и «кататония»). Критерием отбора служила длительность реакции каталептического застывания в домашней клетке в ответ на слабый стрессирующий стимул. Таким образом, предполагалось создание линии животных, моделирующей симптомы шизофрении кататонического типа. Показано, что крысы полученной линии ГК имеют ряд биохимических и поведенческих особенностей, соответствующих характеристикам у больных шизофренией и депрессией (Колпаков и др., 2004).

Одним из условий для признания экспериментальной модели шизофренической патологии валидной является наличие сниженной реакции престаимпульного торможения у животных (Swerdlow et al., 2008; Powell et al., 2009). Этот феномен отражает способность центральной нервной системы к сенсомоторной фильтрации. Снижение престаимпульного торможения было обнаружено при шизофрении (Martinez-Gras et al., 2009), заболеваниях аутистического спектра (Perry et al., 2007), а также при некоторых других психических и нейродегенеративных заболеваниях.

Престаимпульное торможение, вызванное звуковым раздражением рефлекса вздрагивания, заключается в снижении реакции на предъявляемый стимул, если за 20–800 миллисекунд ему предшествует подпороговый звуковой раздражитель (Hoffman, Wible, 1970). Престаимпульное торможение акустического рефлекса вздрагивания характерно не только для человека, но и для ряда видов животных, что позволяет использовать этот показатель в качестве потенциального маркера психопатологии при исследованиях, проводимых на экспериментальных моделях (Joobert et al., 2002). Однако исследования способности ЦНС к сенсомоторной фильтрации информации у крыс инбредной линии ГК ранее не проводились.

Важную роль в реализации реакции престаимпульного торможения в ответ на звуковые стимулы играет средний мозг, поскольку показано, что в реализации этой реакции обязательно участвуют четверохолмие и педункулопонтинное тегментальное ядро среднего мозга (Li et al., 1998; Yeomans et al., 2006; Li et al., 2009). Кроме того, установлено, что норадренергическая система мозга влияет на проявление реакции престаимпульного торможения, в частности, через активацию центральных альфа-адренорецепторов (Shishkina et al., 2004; Alsene et al., 2006). Известна также связь реакции престаимпульного торможения с уровнем экспрессии катехол-О-метилтрансферазы (Swerdlow et al., 2013). Ранее у крыс линии ГК были выявлены изменения по содержанию норадреналина и дофамина в структурах мозга (Alekhina et al., 1994) и отличия по уровню экспрессии мРНК адренорецепторов в ЦНС (Рязанова и др., 2012), что свидетельствует об измененной функции данных систем и может влиять на реакцию престаимпульного торможения у этих животных.

Целью работы было исследовать реакцию престаимпульного торможения у инбредной линии крыс ГК с генетической кататонией как гипотетической модели шизофреноподобного нарушения и изучить связь реакции престаимпульного торможения у крыс ГК с экспрессией мРНК генов тирозингидроксилазы, катехол-О-метил-

трансферазы, альфа1А- и альфа2А-адренорецепторов в среднем мозге.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные. Работа выполнена на 7-месячных инбредных крысах линии ГК и WAG (Wistar Albino Glaxo), которые, как и крысы линии ГК, были получены из популяции Вистар. Крысы содержались в индивидуальных клетках в виварии ИЦиГ СО РАН при свободном доступе к воде и корму. Все опыты на животных выполнены в соответствии с порядком проведения процедур на животных согласно приказу № 755 от 12 августа 1977 г. и по международным рекомендациям (Этический кодекс от 1985 г.) и одобрены биоэтической комиссией ИЦиГ СО РАН (протокол № 34 от 15.06.2016). С помощью тестирования на «каталепсию» были отобраны крысы ГК с наибольшей выраженностью «застывания» (более 10 с). Из них сформировали две группы: 1) крысы ГК и WAG (группа интактные), у которых изучали экспрессию мРНК генов; 2) крысы ГК и WAG (PPI-группа), у которых исследовали престаимпульное торможение (prepulse inhibition – PPI) в установке Startle и сразу после тестирования проводили декапитацию и брали биологический материал для дальнейшего определения экспрессии мРНК исследуемых генов.

Тест на каталепсию проводили в соответствии с традиционным селекционным методом (Барыкина и др., 1983). Животному придавали вертикальное положение в углу клетки, осторожно приподнимая тело за передние лапки палочкой. Регистрировали время удержания приданной таким образом позы после того, как палочка была убрана. Тестирование проводилось два раза в разные дни. В эксперимент были отобраны крысы, которые застывали в такой позе не менее 10 с. Размер выборки, из которой осуществляли отбор, – 29 крыс.

Оценка престаимпульного торможения (PPI) была проведена с использованием прибора TSE Startle Response System (Германия). Аппарат для измерения амплитуды реакции вздрагивания представляет собой звуко- и светонепроницаемую вентилируемую камеру с чувствительной к колебаниям платформой, на которую помещается клетка с животным. Тестирование проводилось в темноте, на фоне белого шума силой 65 дБ, так же как и в более ранних исследованиях на аутбредных крысах линии ГК (Попова и др., 1999; Барыкина и др., 2002). Длительность всех звуковых сигналов (белый шум) составляла 40 мс. Основной звуковой стимул имел силу 115 дБ. В качестве подпороговых престаимулов были выбраны сигналы силой 85 дБ (Попова и др., 1999; Барыкина и др., 2002), а также силой 75 и 70 дБ. Время между отдельными испытаниями было случайным в интервале 10–20 с. Регистрация амплитуды рефлекса вздрагивания велась с момента подачи основного звукового стимула в течение 200 мс. После трехминутной адаптации к условиям тестирования проводилось автоматическое измерение базальной активности животного в течение 30 с. После этого подавались 10 звуковых стимулов (115 дБ) для габитации и стабилизации стартл-рефлекса. Затем следовал блок испытаний, результаты которых использовались для расчета PPI. Блок состоял из 40 испытаний, где в случайном

Table 1. Primers used in the study

Gene	Primer sequence	T, °C		Amplicon size, bp.
		annealing	detection	
<i>Th</i>	F: 5'-GCAGCCCTACCAAGATCAAA-3' R: 5'-AACTTCACAGAGAATGGGCG-3'	61	82	120
<i>Adra1A</i>	F: 5'-TGCCATCTTTGAGATCCTG-3' R: 5'-GGTAGCTCACACCAATGTA-3'	64	84	143
<i>Adra2A</i>	F: 5'-TATGGGCTACTGGTACTTT-3' R: 5'-CCCACACAGTGACAATGAT-3'	63	87	191
<i>Comt</i>	F: 5'-CTTGACCACTGGAAAGACCG-3' R: 5'-CGATGACGTTGTCAGCTAGGA-3'	63	82	100
<i>Ppia</i>	F: 5'-TTCCAGGATTCATGTGCCAG-3' R: 5'-CTTGCCATCCAGCCACTC-3'	61–64	82	206

порядке подавались четыре типа сигнала (сигнал каждого типа предъявлялся 10 раз): 1) одиночный сигнал силой 115 дБ; 2) сигнал с предстимулом первого типа: престоимул силой 70 дБ, через 100 мс стимул 115 дБ; 3) сигнал с предстимулом второго типа: престоимул силой 75 дБ, через 100 мс стимул 115 дБ; 4) сигнал с предстимулом третьего типа: престоимул силой 85 дБ, через 100 мс стимул 115 дБ.

Престимульное ингибирование вычисляли по формуле: $PPI\ (\%) = (P - PP) \times 100 / P$, где PP – усредненная по 10 испытаниям амплитуда реакции вздрагивания на стимул, подаваемый после престоимула; P – усредненная по 10 испытаниям амплитуда реакции вздрагивания на стимул.

Определение количества мРНК методом ПЦР в реальном времени. Крыс линии ГК и WAG быстро декапитировали и забирали биологический материал. РНК из среднего мозга крыс выделяли с использованием TRI Reagent (Molecular Research Center, США) согласно рекомендациям производителя.

Примеси геномной ДНК удаляли обработкой ДНКазой, свободной от РНКаз (Promega, США), после чего останавливали работу фермента осаждением 96 % этанолом с натрийацетатом (рН 4.2–4.4) и оставляли на ночь на $-20\ ^\circ\text{C}$. Затем центрифугировали в течение 10 мин и осадок РНК растворяли в деионизованной воде. Качество выделенной РНК оценивали электрофорезом в 1 % агарозном геле, количество – по оптической плотности при 260 нм.

Для получения кДНК смешивали 3 мкг РНК и 0.25 нмоль «случайных» (random N9) праймеров-наномеров («Биосинтез», Россия). Конечный раствор объемом 50 мкл содержал: 3 мкг РНК и 0.25 нмоль «случайных» праймеров-наномеров («Биосинтез», Россия), 5 мкл буфера F2, 5 мкл 4 mM dNTP, 25 мкл 40 % трегалозы, 1 мкл BSA (10 мг/мл) и 5 мкл 40 ед. акт. обратной транскриптазы MoMLV (реактивы производства «Вектор-Бест», Россия). Синтез кДНК проводили при $37\ ^\circ\text{C}$ – 1 ч, $42\ ^\circ\text{C}$ – 30 мин, $50\ ^\circ\text{C}$ – 10 мин. Фермент инактивировали прогревом смеси при $75\ ^\circ\text{C}$ в течение 5 мин. В дальнейшем для каждого образца кДНК делали проверочную постановку ПЦР в реальном времени с праймерами гена домашнего хозяйства *Ppia* для контроля обратной транскрипции. Кроме того, проводили ПЦР с РНК для проверки на присутствие

геномной ДНК в образцах. Для последующей ПЦР использовали 0.25–0.5 мкл полученной кДНК.

Полуколичественную оценку экспрессии мРНК генов альфа1А- и альфа2А-адренорецепторов, тирозингидроксилазы и катехол-О-метилтрансферазы выполняли по отношению к экспрессии мРНК гена «домашнего хозяйства» циклофелина А (*Ppia*) как внутреннего контроля полимеразной цепной реакции. В работе использовали амплификатор CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала буфер F2 для ПЦР («Вектор-Бест», Россия), 0,2 mM dNTPs, SYBR Green I («Медиген», Россия) в разведении 1 : 20000, по 150 нМ прямого и обратного праймеров и 1 ед. акт. hot-Start полимеразы («Вектор-Бест», Россия). Реакцию проводили в следующих условиях: предварительный прогрев при $94\ ^\circ\text{C}$ в течение 3 мин; после этого следовали 38–45 циклов: денатурация при $94\ ^\circ\text{C}$ – 15 с, отжиг – 20 с, элонгация при $72\ ^\circ\text{C}$ – 20 с, сбор данных по флуоресценции для *Ppia* при $83\ ^\circ\text{C}$ – 10 с, сбор данных по флуоресценции для целевых образцов – 10 с. После окончания ПЦР снимали кривые плавления для контроля специфичности реакции. Из полученных образцов кДНК для каждого органа делали «усредненный» раствор кДНК, который использовали для построения калибровочных кривых, по которым определяли относительный уровень кДНК для целевых генов и гена сравнения в образцах.

Праймеры, используемые для определения экспрессии исследуемых генов (табл. 1), были подобраны с использованием онлайн-олигоанализатора с сайта www.eutdtna.com и проверены в базе данных Blast (Basic Local Alignment Search Tool) на специфичность (Рязанова, 2012; Ryazanova et al., 2016).

Статистическая обработка проведена с использованием пакета программ Statistica 6.0. Влияние факторов генотипа, процедуры исследования престоимпульного торможения и взаимодействия этих факторов на экспрессию генов оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA), post-hoc сравнения проводили по LSD-критерию Фишера. Для оценки реакции престоимпульного ингибирования применяли методы непараметрической статистики с использованием U-критерия

Манна–Уитни для малых выборок. При корреляционном анализе использовали непараметрический критерий Спирмена, при статистической оценке результатов тестирования на каталепсию – *t*-критерий Стьюдента.

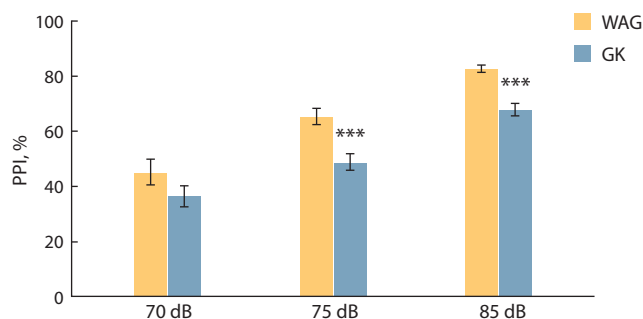
Результаты и обсуждение

Исследование каталептической реакции подтвердило более длительное застывание у крыс линии ГК: 12.95 ± 3.86 для ГК и 3.29 ± 1.07 для WAG (по *t*-критерию Стьюдента, $p < 0.01$).

В нашей работе, а также в ряде других (Lehmann et al., 1999; Hohnadel et al., 2007; Rohleder et al., 2014) показано, что величина PPI зависит от силы престаимула. При силе престаимула 70 дБ межлинейных различий по уровню престаимпульного торможения не обнаружено. Впервые выявлено снижение уровня PPI у крыс линии ГК по сравнению с крысами линии WAG при силе престаимула 75 дБ (по Манну–Уитни: $U = 24.0$, $p < 0.001$) и 85 дБ (по Манну–Уитни: $U = 25.0$, $p < 0.001$) (рисунок). На более ранних этапах селекции у аутбредных крыс линии ГК при силе престаимула 85 дБ удалось найти только отрицательную корреляцию между длительностью каталептического застывания и значением PPI, тогда как различий с контрольной линией обнаружено не было (Барыкина и др., 2002).

Дефицит престаимпульного торможения рассматривается в качестве эндотипа нейropsychических заболеваний и широко используется при характеристике новых экспериментальных животных моделей (Swerdlow et al., 2008). Снижение PPI у животных, вызываемое различными воздействиями, предлагается как экспериментальная модель шизофрении (Swerdlow et al., 1994; Ellenbroek et al., 1995; Le Pen et al., 2002). Сниженная реакция престаимпульного торможения, обнаруженная у инбредных крыс линии ГК, может говорить о нарушении в процессах фильтрации сенсорной информации у крыс этой линии и свидетельствует в пользу функционального сходства ее (как предполагаемой генетической модели шизофренической психопатологии) с прототипом.

Исследование влияния фактора тестирования и фактора генотипа на экспрессию мРНК исследуемых генов с помощью двухфакторного дисперсионного анализа выявило достоверное влияние фактора генотипа ($F_{1,20} = 6.57$; $p < 0.05$) на экспрессию мРНК *Adra1A*; post-hoc анализ показал сниженную экспрессию мРНК *Adra1A* у крыс группы «ГК интактные» по сравнению с крысами «WAG интактные» ($p < 0.05$) (табл. 2). Эти данные подтверждают более ранние исследования по экспрессии



Prepulse inhibition in GC and WAG rats.

X-Axis: prepulse amplitude. *** Difference from WAG significant at $p < 0.001$ according to the Mann–Whitney test.

мРНК *Adra1A* у крыс ГК в среднем мозге (Рязанова и др., 2012). Такое воспроизведение результатов по количеству мРНК гена *Adra1A* в разных поколениях крыс линии ГК указывает на стабильно измененную экспрессию этого гена в среднем мозге животных.

Альфа1A-адренорецептор – основной подтип альфа1-адренорецепторов ($\alpha 1$ -AP), который является постсинаптическим и осуществляет передачу сигнала, опосредуя эффекты норадреналина. Показано, что введение в желудочки мозга теразозина – антагониста альфа1-AP, вызывает дозозависимую ингибицию двигательной активности и каталепсию у мышей и крыс, которую можно предотвратить совместным введением агониста (фенилэфрин) (Stone et al., 1999, 2003b). Кроме того, блокирование синтеза норадреналина вызывает заметное снижение поведенческой активности, которую, в свою очередь, можно повысить внутримозговым введением норадреналина. При этом эффект норадреналина блокируется совместным введением теразозина (Stone et al., 2003a), что свидетельствует о важной роли альфа1-AP в регуляции норадреналиновой нейротрансмиссии и поведения. Таким образом, выявленное снижение экспрессии мРНК гена *Adra1A* в среднем мозге у крыс ГК указывает на изменения в адренорецепторном звене, которые могут быть связаны с развитием тормозных реакций и влиять на проявление кататонических ответов.

Кроме того, ингибция альфа1-адренорецепторов вызывает депрессивно-подобное поведение (Stone, Quartermain, 1999), а стимуляция именно альфа1A-адренорецепторов уменьшает депрессию и тревожное поведение (Doze et al., 2009). Эти данные хорошо согласуются со сниженной

Table 2. Expression of *Adra1A*, *Adra2A*, *Comt*, and *Th* mRNAs in the midbrain of GC and WAG rats

Gene	GC intact (n = 6)	WAG ntact (n = 6)	GC PPI (n = 5)	WAG PPI (n = 6–7)
<i>Th</i>	0.99 ± 0.07	0.89 ± 0.07	0.98 ± 0.04	1.06 ± 0.07
<i>Adra1A</i>	$0.84 \pm 0.06^*$	1.02 ± 0.08	0.86 ± 0.03	0.99 ± 0.05
<i>Adra2A</i>	0.81 ± 0.08	0.93 ± 0.09	0.99 ± 0.03	1.11 ± 0.05
<i>Comt</i>	0.93 ± 0.05	0.98 ± 0.02	0.94 ± 0.04	0.96 ± 0.04

Parentthesized are numbers of animals in the groups. * $p < 0.05$ vs WAG intact; two-way ANOVA, LSD test.

экспрессией альфа1А-адренорецептора в среднем мозге крыс ГК, которые также имеют биохимические и поведенческие изменения, характерные для депрессивного состояния (Колпаков и др., 2004). Таким образом, снижение уровня мРНК *Adra1A* в среднем мозге может быть связано с проявлением депрессивно-подобного поведения у крыс ГК в поведенческих тестах (Колпаков и др., 2004).

Имеются данные, показывающие, что стимуляция альфа1-адренорецепторов мозга приводит к нарушению реакции претимпульного торможения (Carasso et al., 1998; Alsene et al., 2006) и этот эффект может быть заблокирован антагонистами альфа1-адренорецепторов, но не блокадой дофаминовых D2-рецепторов (Carasso et al., 1998). Тогда активация альфа1-адренорецепторов может представлять важный механизм, посредством которого норадренергическая система модулирует реакцию претимпульного торможения. У крыс линии ГК претимпульное торможение снижено, при этом снижена также экспрессия мРНК гена *Adra1A* в среднем мозге. Насколько эти изменения в экспрессии мРНК гена *Adra1A* отражаются на плотности/активности рецептора и насколько вовлечены альфа1А-адренорецепторы в реализацию реакции претимпульного торможения у крыс ГК, нам еще предстоит изучить.

Достоверных различий по экспрессии исследуемых генов в среднем мозге у интактных крыс и крыс соответствующей линии после тестирования на РРІ не обнаружено. Выявленные результаты показывают, что 25-минутное тестирование в установке TSE Startle Response System для оценки претимпульного торможения, после которого проводилось взятие биологического материала, не успевало повлиять на изменение уровня мРНК.

Проведенный анализ не выявил корреляционных взаимосвязей между экспрессией мРНК генов *Adra1A*, *Adra2A*, *Th*, *Comt* в среднем мозге и реакцией претимпульного торможения у крыс линии ГК. По-видимому, наибольшее влияние на реализацию РРІ у крыс ГК могут оказывать другие звенья катехоламинергических систем мозга, возможно, изменение количества самих ферментов – тирозингидроксилазы, катехол-О-метилтрансферазы и др., а также изменение плотности/активности рецепторов. Несмотря на то что в других исследованиях была показана связь выраженности реакции претимпульного торможения с уровнем экспрессии мРНК гена *Comt* в мозге (Swerdlow et al., 2012, 2013), подобной зависимости между РРІ и уровнем мРНК гена *Comt* в среднем мозге у крыс ГК не обнаружено. Катехол-О-метилтрансфераза участвует в распаде не только норадреналина, но и дофамина (Kvetnansky et al., 2009). Вероятно, именно количеством дофамина обусловлена зависимость экспрессии мРНК гена *Comt* и реакции претимпульного торможения, поскольку известно, что дофаминовая система мозга также вовлечена в реализацию РРІ (Weber et al., 2010; Swerdlow et al., 2013). Связь работы других звеньев катехоламинергических систем мозга со снижением реакции претимпульного торможения у крыс линии ГК еще предстоит исследовать.

Сниженная реакция претимпульного торможения свидетельствует в пользу функционального сходства крыс линии ГК как предполагаемой генетической модели шизофренической психопатологии с прототипом. Нарушение реакции претимпульного торможения у крыс ГК

не связано с экспрессией мРНК генов *Adra1A*, *Adra2A*, *Th*, *Comt* в среднем мозге. Сниженная экспрессия мРНК гена альфа1А-адренорецептора в среднем мозге крыс линии ГК указывает на изменения в адренорецепторном звене, которые могут быть связаны с развитием тормозных реакций и влиять на проявление кататонии.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-04-01325, and State Budgeted Project 0324-2016-0002.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alekhina T.A., Gilinsky M.A., Kolpakov V.G. Catecholamines level in the brain of rats with a genetic predisposition to catatonia. *Biogenic Amines*. 1994;10(5):443-449.
- Alsene K.M., Carasso B.S., Connors E.E., Bakshi V.P. Disruption of prepulse inhibition after stimulation of central but not peripheral α -1 adrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(10):2150-2161. DOI 10.1038/sj.npp.1300989.
- Barykina N.N., Alekhina T.A., Chuguy V.F., Petrenko O.I., Popova N.K., Kolpakov V.G. Negative correlation between cataleptic freezing and prepulse inhibition of the startle reflex in rats. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2002;88(11):1388-1393. (in Russian)
- Barykina N.N., Chepkasov I.L., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. Breeding of Wistar rats for predisposition to catalepsy. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1983;19(12):2014-2021. (in Russian)
- Carasso B.S., Bakshi V.P., Geyer M.A. Disruption in prepulse inhibition after alpha-1 adrenoceptor stimulation in rats. *Neuropharmacology*. 1998;37(3):401-404. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00051-3).
- Doze V.A., Handel E.M., Jensen K.A., Darsie B., Luger E.J., Haselton J.R., Talbot J.N., Rorabaugh B.R. Alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenergic receptors differentially modulate antidepressant-like behavior in the mouse. *Brain Res*. 2009;1285:148-157. DOI 10.1016/j.brainres.2009.06.035.
- Ellenbroek B.A., Geyer M.A., Cools A.R. The behavior of APO-SUS rats in animal models with construct validity for schizophrenia. *J. Neurosci*. 1995;15(11):7604-7611. DOI 0270-6474/95/157604-08\$05.00/O.
- Hoffman H.S., Wible B.L. Role of weak signals in acoustic startle. *J. Acoust. Soc. Am*. 1970;47:489-497. DOI 10.1121/1.1911919.
- Hohnadel E., Bouchard K., Terry A.V. Galantamine and donepezil attenuate pharmacologically induced deficits in prepulse inhibition in rats. *Neuropharmacology*. 2007;52(2):542-551. DOI 10.1016/j.neuropharm.2006.08.025.
- Joobor R., Boksa P., Benkelfat C., Rouleau G. Genetics of schizophrenia: from animal models to clinical studies. *J. Psychiatry Neurosci*. 2002;27(5):336-347.
- Kolpakov V.G., Kulikov A.V., Alekhina T.A., Chuguy V.F., Petrenko O.I., Barykina N.N. Catatonia or depression: The GC rat strain as an animal model of psychopathology. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2004;40(6):827-834. DOI 10.1023/B:RUGE.0000033315.79449.d4. (in Russian)
- Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol. Rev*. 2009;89(2):535-606. DOI 10.1152/physrev.00042.2006.
- Le Pen G., Moreau J.L. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(1):1-11. DOI 10.1016/S0893-133X(01)00383-9.

- Lehmann J., Pryce C.R., Feldon J. Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 1999;104(1-2):113-117. DOI 10.1016/S0166-4328(99)00058-3.
- Li L., Du Y., Li N., Wu X., Wu Y. Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2009;33(8):1157-1167. DOI 10.1016/j.neubiorev.2009.02.001.
- Li L., Korngut L.M., Frost B.J., Beninger R.J. Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: prepulse intensity functions. *Physiol. Behav.* 1998;65(1):133-139. DOI 10.1016/S0031-9384(98)00143-7.
- Martinez-Gras I., Rubio G., del Manzano B.A., Rodriguez-Jimenez R., Garcia-Sanchez F., Bagney A., Leza J.C., Borrell J. The relationship between prepulse inhibition and general psychopathology in patients with schizophrenia treated with long-acting risperidone. *Schizophr. Res.* 2009;115(2-3):215-221. DOI 10.1016/j.schres.2009.09.035.
- Perry W., Minassian A., Lopez B., Maron L., Lincoln A. Sensorimotor gating deficits in adults with autism. *Biol. Psychiatry.* 2007;61(4):482-486. DOI 10.1016/j.biopsych.2005.09.025.
- Popova N.K., Barykina N.N., Alekhina T.A., Naumenko K.S., Kulikov A.V. Effects of 5-HT₂-receptor blockade on the startle reflex and its prepulse inhibition in different mouse and rats strains. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal.* 1999;85(6):857-864. (in Russian)
- Powell S.B., Zhou X., Geyer M.A. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 2009;204(2):282-294. DOI 10.1016/j.bbr.2009.04.021.
- Rohleder C., Jung F., Mertgens H., Wiedermann D., Sué M., Neumaijer B., Graf R., Leweke F.M., Endepols H. Neural correlates of sensorimotor gating: a metabolic positron emission tomography study in awake rats. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:178. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00178.
- Ryazanova M.A., Fedoseeva L.A., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. The gene-expression profile of renal medulla in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *BMC Genet.* 2016;17(3):166-173. DOI 10.1186/s12863-016-0462-6.
- Ryazanova M.A., Igonina T.N., Alekhina T.A., Prokudina O.I. The increase in the proportion of nervous animals among those bred for catatonia: The participation of central adrenergic receptors in catatonic reactions. *Genetika = Genetics (Moscow).* 2012;48(11):1-8. DOI 10.1134/S1022795412100092. (in Russian)
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Popova N.K., Dygalo N.N. Influence of neonatal short-term reduction in brainstem alpha2A-adrenergic receptors on receptor ontogenesis, acoustic startle reflex, and prepulse inhibition in rats. *Behav. Neurosci.* 2004;118(6):1285-1292. DOI 10.1037/0735-7044.118.6.1285.
- Stone E.A., Grunewald G.L., Lin Y., Ahsan R., Rosengarten H., Kramer H.K., Quartermain D. Role of epinephrine stimulation of CNS α 1-adrenoceptors in motor activity in mice. *Synapse.* 2003a;49:67-76. DOI 10.1002/syn.10212.
- Stone E.A., Lin Y., Quartermain D. Immobility from administration of the α 1-adrenergic antagonist, terazosin, in the IVth ventricle in rats. *Neurosci. Lett.* 2003b;353:231-233. DOI 10.1016/j.neulet.2003.09.033.
- Stone E.A., Quartermain D. Alpha-1-noradrenergic neurotransmission, corticosterone, and behavioral depression. *Biol. Psychiatry.* 1999;46:1287-1300. DOI 10.1016/S0006-3223(99)00234-6.
- Stone E.A., Zhang Y., Rosengarten H., Yeretsian J., Quartermain D. Brain alpha 1-adrenergic neurotransmission is necessary for behavioral activation to environmental change in mice. *Neuroscience.* 1999;94:1245-1252. DOI 10.1016/S0306-4522(99)00394-2.
- Swerdlow N.R., Light G.A., Trim R.S., Breier M.R., Hines S.R., Powell S.B. Forebrain gene expression predicts deficits in sensorimotor gating after isolation rearing in male rats. *Behav. Brain Res.* 2013;257:118-128. DOI 10.1016/j.bbr.2013.09.005.
- Swerdlow N.R., Braff D.L., Taaid N., Geyer M.A. Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *ArchGen Psychiatry.* 1994;51(2):139-154. DOI 10.1001/archpsyc.1994.03950020063007.
- Swerdlow N.R., Shilling P.D., Breier M., Trim R.S., Light G.A., Marie R.S. Fronto-temporal-mesolimbic gene expression and heritable differences in amphetamine-disrupted sensorimotor gating in rats. *Psychopharmacology.* 2012;224(3):349-362. DOI 10.1007/s00213-012-2758-1.
- Swerdlow N.R., Weber M., Qu Y., Light G.A., Braff D.L. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology.* 2008;199(3):331-388. DOI 10.1007/s00213-008-1072-4.
- Weber M., Chang W.L., Breier M.R., Yang A., Millan M.J., Swerdlow N.R. The effects of the dopamine D2 agonist sumanirole on prepulse inhibition in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2010;20(6):421-425. DOI 10.1016/j.euroneuro.2010.02.011.
- Yeomans J.S., Lee J., Yeomans M.H., Steidl S., Li L. Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. *Neuroscience.* 2006;142(4):921-929. DOI 10.1016/j.neuroscience.2006.06.025.

Влияние нокаута гена *Zbtb33* и бактериального липополисахарида на поведение в домашней клетке у мышей

Н.В. Хоцкин✉, И.Е. Сорокин, Е.А. Куликова, А.В. Куликов

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

Ген *Zbtb33* кодирует бимодальный репрессор транскрипции Kaiso, который вызывает эпигенетическую репрессию генов посредством связывания с метилированными островками mCpG в промоторах этих генов. Несмотря на то что Kaiso интенсивно экспрессируется в центральной нервной системе, его участие в регуляции поведения изучено слабо. Так, было показано только участие Kaiso в регуляции поведенческой реакции на эмоциональный стресс в тестах «открытое поле» и «принудительное плавание». Целью данного исследования является выяснение роли, которую играет Kaiso в регуляции суточной активности, а также поведенческого ответа на стимуляцию неспецифического иммунитета. Опыты проводились на половозрелых самцах мышей с нокаутом гена *Zbtb33* (KO) и животных линии C57BL/6 (дикий тип, WT). Все животные были в возрасте 11 недель, имели SPF (specific pathogen free) статус на протяжении всего эксперимента. Животных каждого генотипа разделяли на три выравненные по весу группы по восемь животных в каждой. Вначале измеряли суточную динамику двигательной активности, сна, потребления пищи и воды интактных животных с помощью программно-аппаратного комплекса PhenoMaster. Затем животным каждой группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (контроль), 0.1 или 1.0 мг/кг бактериального липополисахарида (ЛПС), растворенного в физиологическом растворе, и вновь измеряли суточную активность, потребление пищи и воды. Интактные мыши KO и WT не различались по среднесуточным двигательной активности и продолжительности сна. Однако интактные мыши KO были менее активны в темное время суток, а также потребляли меньше пищи и воды по сравнению с интактными животными WT. Обе дозы ЛПС подавляли двигательную активность, увеличивали продолжительность сна и вызывали анорексию у мышей обоих генотипов. Однако эффект низкой дозы ЛПС (0.1 мг/кг) на потребление пищи и воды был более выражен у мышей KO, чем у животных WT. Полученные результаты проливают свет на биологическую значимость гена Kaiso и служат обоснованием необходимости нормального функционирования этого гена в природных популяциях.

Ключевые слова: ген Kaiso; нокаутные мыши; PhenoMaster; домашняя клетка; LPS.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хоцкин Н.В., Сорокин И.Е., Куликова Е.А., Куликов А.В. Влияние нокаута гена *Zbtb33* и бактериального липополисахарида на поведение в домашней клетке у мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):804-809. DOI 10.18699/VJ17.297

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khotskin N.V., Sorokin I.E., Kulikova E.A., Kulikov A.V. Effect of *Zbtb33* gene knockout and bacterial lipopolysaccharide on home cage behavior in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):804-809. DOI 10.18699/VJ17.297 (in Russian)

Effect of *Zbtb33* gene knockout and bacterial lipopolysaccharide on home cage behavior in mice

N.V. Khotskin✉, I.E. Sorokin, E.A. Kulikova, A.V. Kulikov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The *Zbtb33* gene encodes the bimodal transcriptional repressor Kaiso, which causes epigenetic repression of genes by binding to methylated mCpG islets in the promoters of the genes. Despite the fact that Kaiso is intensively expressed in the central nervous system, its participation in the regulation of behavior is still poorly understood. Only the participation of Kaiso in the regulation of the behavioral response to emotional stress in the open field and forced swimming tests has been shown. The aim of this study is to elucidate the role that Kaiso plays in regulating daily activity, as well as the behavioral response to stimulation of nonspecific immunity. Experiments were performed on adult male mice with *Zbtb33* gene knockout (KO) and animals of the C57BL/6 line (wild type, WT). All animals were 11 weeks old, weighed 26 ± 1 g and had SPF (specific pathogen free) status throughout the experiment. The animals of each genotype were divided into three weighted groups of 8 animals each. Initially, the daily dynamics of motor activity, sleep, food and water intake of intact animals was measured using the PhenoMaster software-hardware complex. The animals of each group were then injected with saline (control), 0.1 or 1.0 mg/kg of bacterial lipopolysaccharide (LPS) dissolved in saline, and again measured for their daily activity, food and water intake. Intact KO and WT mice did not differ in the average daily motor activity and sleep duration. However, intact KO mice were less active in the dark time, and also consumed less food and water as compared to intact WT animals. LPS at both doses suppressed motor activity, prolonged sleep duration and caused anorexia in mice of both genotypes. However, the effect of low dose of LPS (0.1 mg/kg) on the food and water intake was more pronounced in KO mice than in WT animals. The results shed light on the biological significance of the Kaiso gene and serve as a justification for the necessity of the normal functioning of this gene in natural populations.

Key words: Kaiso gene; knockout mice; PhenoMaster; home cage; LPS.

Метилирование цитозина в молекуле ДНК играет важную роль в процессе контроля экспрессии генов у позвоночных путем длительной фиксации транскрипционно неактивного состояния генов (Klose, Bird, 2006). Метилированные цитозины длительное время сохраняют изменения экспрессии генов в процессе онтогенеза (Bird, 2002). Стабильность метилированных цитозина лежит в основе гипотезы об эпигенетической пластичности нейронов и долговременной памяти, которая предполагает, что следы событий в жизни сохраняются в виде различных модификаций ДНК (Bali et al., 2011; Lubin et al., 2011).

Специализированные белки-репрессоры узнают метилированные районы ДНК и привлекают к ним белковые комплексы, репрессирующие транскрипцию (Wade, 2001; Bogdanovic, Veenstra, 2009). Одним из таких белков является Kaiso (кодируется геном *Zbtb33*) – бимодальный репрессор транскрипции. Kaiso входит в семейство белков VTB/POZ и содержит два функциональных домена: три «цинковых пальца» типа C2H2 на C-конце и N-концевой VTB/POZ домен. Своими цинковыми пальцами он связывается как с канонической последовательностью, так и с метилированными участками mCpGmCpG ДНК и привлекает репрессорные комплексы за счет взаимодействия с VTB/POZ доменом (Filion et al., 2006).

Ген Kaiso интенсивно экспрессируется в мозге млекопитающих (Della Ragione et al., 2006; Shumskaya et al., 2015; Kulikov et al., 2016), и можно ожидать, что он играет существенную роль в регуляции нервной системы и поведения. Однако роль Kaiso в регуляции поведения изучена очень слабо. Показано только, что у лишенных Kaiso мышей наблюдается повышенная моторная активность в условиях эмоционального стресса в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» (Коростина, Куликов, 2015; Kulikov et al., 2016). Кроме того, нокаут гена *Zbtb33* оказывал выраженный антидепрессантный эффект в тесте «принудительное плавание» у мышей (Коростина, Куликов, 2015).

Активация врожденного иммунитета бактериальным липополисахаридом (ЛПС) вызывает «синдром поведения больного» (sickness syndrome), выражающийся в снижении двигательной активности и анорексии (Dantzer, 2009). В то же время показано, что ЛПС подавляет экспрессию ДНК метилтрансферазы 3a и, следовательно, может влиять на интенсивность метилирования в клетках микроглии мышей C57BL/6 (Matt et al., 2016).

Целью нашей работы было изучение влияния нокаута гена *Zbtb33*, ЛПС и их взаимодействия на суточную динамику активности, сна, потребления пищи и воды в домашней клетке у мышей с нокаутом гена *Zbtb33* (KO) и дикого типа (WT).

Материалы и методы

Животные. Исследования проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). Опыты выполняли на половозрелых самцах мышей линий с нокаутом гена *Zbtb33* C57BL/6/Kaiso (KO, $n = 24$) и линии C57BL/6 (WT, $n = 24$), которая служила

генетическим фоном при создании линии C57BL/6/Kaiso. Последняя была создана Е.Б. Прохорчуком (Prokhortchouk et al., 2006) и получена в SPF-виварий ИЦиГ СО РАН из питомника лабораторных животных РАН «Пушино» (г. Пушкино, Россия). Все животные были в возрасте 11 недель и имели массу тела 26 ± 1 г. С момента отсадки от матерей мышей содержали в группах по шесть особей в индивидуально вентилируемых пластиковых клетках (Optimice) при регулируемом 14-часовом освещении, температуре 23 °C и влажности 60 %. Полноценный корм и воду они получали без ограничения. Содержание мышей и все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Директива 86/309 Европейского сообщества от 24 декабря 1986 г.) и одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

Введение ЛПС. ЛПС (*Escherichia coli*, Sigma-Aldrich, США) разводили в стерильном физиологическом растворе в концентрации 0.1 мг/10 мл или 1 мг/10 мл и вводили внутривентально в объеме 0.1 мл на 10 г массы тела. Контрольным животным вводили внутривентально 0.1 мл стерильного физиологического раствора на 10 г массы тела.

Измерение суточной активности. Суточную активность, сон и потребление пищи в домашней клетке исследовали с помощью программно-аппаратного комплекса PhenoMaster (TSE Systems) согласно инструкциям от производителя. Установка состоит из восьми индивидуальных клеток с инфракрасными датчиками, фиксирующими перемещение животного. Поилка и кормушка также подсоединены к датчикам для учета потребляемой пищи и воды. Каждую минуту информация с датчиков поступает на компьютер, где обрабатывается программным обеспечением, поставляемым фирмой-производителем. В результате получены данные по потреблению пищи и воды, пройденному пути, скорости животного и времени, проведенному во сне.

Самцов помещали по одному в клетку и в течение двух суток фиксировали все параметры. Первые сутки считались адаптационными и не учитывались при последующем обсчете. Таким образом, в конечном анализе для оценки базовой активности интактных животных использовались только вторые сутки. После окончания вторых суток животным внутривентально вводили либо физиологический раствор, либо ЛПС в физиологическом растворе в дозе 0.1 или 1.0 мг/кг и активность животных регистрировали в течение последующих 24 ч в установке, с фиксированием вышеуказанных параметров. Согласно инструкции производителя, программа определяет состояние сна как отсутствие подвижности животного в течение 40 с и более.

В первом измерении (на вторые сутки после помещения в PhenoMaster) было две группы по 24 особи в каждой, соответствующие генотипам животных. На третьи сутки было шесть групп по 8 особей, соответствующих шести комбинациям генотипа и ЛПС.

Статистика. Пройденный путь (см), число эпизодов и суммарную длительность сна (мин) за час, количество выпитой воды (мл) и съеденного корма (г) за сутки представляли как средние значения $\pm$ ошибки средних. Динамику

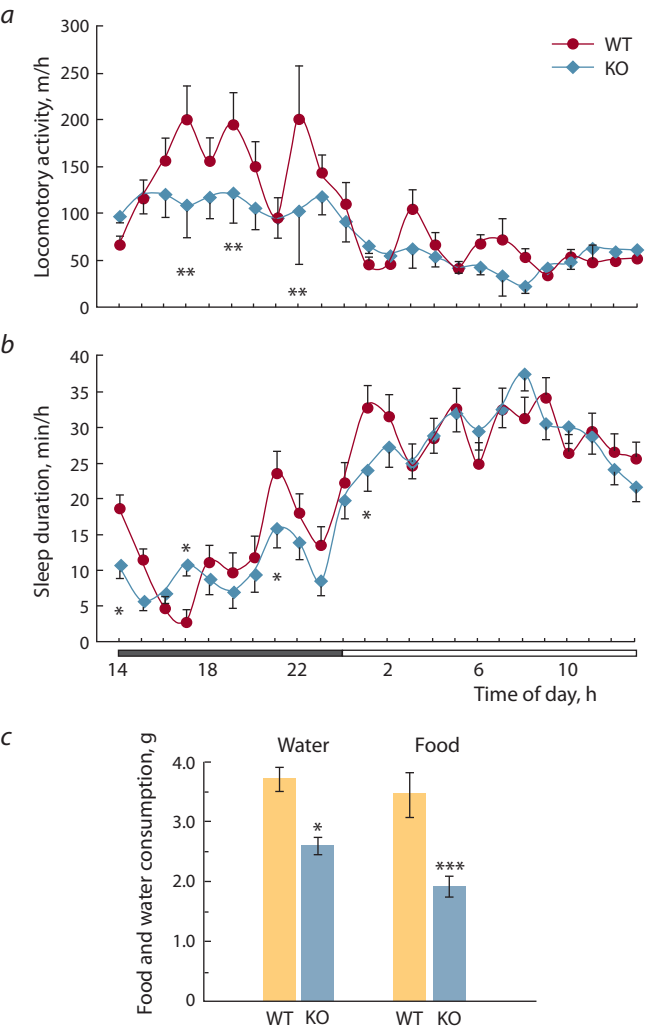


Fig.1. Daily variation of (a) locomotory activity (m/h), (b) sleep duration (min/h) and (c) water and food consumption in the home cage in WT (*n* = 24) and KO (*n* = 24) mice. The dark time from 14 to 0 hrs.
p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001.

двигательной активности и сна интактных животных (на второй день) анализировали с помощью двухфакторного ANOVA для повторных измерений (генотип и время суток как повторяющийся фактор), а после воздействия (на третий день) анализировали с помощью трехфакторного ANOVA для повторных измерений (генотип, воздействие и время суток как повторяющийся фактор). В случае достоверного влияния взаимодействия генотип × время или воздействие × время проводили множественное сравнение по Фишеру. Количество выпитой воды и съеденного корма анализировали с помощью однофакторного (интактные животные) и двухфакторного (после воздействия) ANOVA с последующим множественным сравнением по Фишеру в случае достоверного влияния факторов.

Результаты

Не обнаружено влияния генотипа на средние значения суточной двигательной активности (97.85 ± 11.65 м/ч WT и 78.34 ± 11.65 м/ч KO; $F_{1,46} = 1.4$, $p > 0.05$) и продолжительности сна (22.21 ± 0.95 мин/ч WT и 20.57 ± 0.95 мин/ч KO; $F_{1,46} = 1.5$, $p > 0.05$). В то же время выявлен значительный эффект времени суток ($F_{23,1058} = 10.27$, $p < 0.0001$ – двигательная активность; $F_{23,1058} = 33.18$, $p < 0.0001$ – продолжительность сна) и взаимодействия время суток × генотип ($F_{23,1058} = 1.72$, $p < 0.05$ – двигательная активность; $F_{23,1058} = 1.72$, $p < 0.05$ – продолжительность сна) по этим признакам. Мыши обоих генотипов больше двигались и меньше спали в темное время (рис. 1 а, б). Активность в темное время суток была ниже у мышей KO по сравнению с животными WT (см. рис. 1, а). Суточное потребление воды ($F_{1,46} = 6.64$, $p < 0.05$) и пищи ($F_{1,46} = 50.74$, $p < 0.001$) было снижено у мышей KO по сравнению с животными WT (см. рис. 1, в).

Выявлен значительный эффект ЛПС, но не генотипа или взаимодействия генотип × ЛПС, на двигательную активность в домашней клетке (см. таблицу). Обе дозы ЛПС приводили к аналогичному снижению локомоции у мышей WT и KO в течение 11–12 ч после введения по

ANOVA results on the effects of genotype, LPS, and their interaction on locomotion and sleep duration in the home cage in WT and KO mice

Factor	Locomotion (m/h)	Sleep duration (min/h)
Genotype	$F_{1,42} < 1$	$F_{1,42} = 4.62$, $p < 0.05$
WT	44.93 ± 4.11	29.34 ± 1.0
KO	43.69 ± 4.11	16.26 ± 1.0
LPS	$F_{2,42} = 49.2$, $p < 0.0001$	$F_{2,42} = 28.0$, $p < 0.0001$
Saline	83.86 ± 5.03	21.07 ± 1.22
0.1 LPS	33.26 ± 5.03 ***	28.38 ± 1.22 ***
1.0 LPS	15.81 ± 5.03 *** ^	34.00 ± 1.22 *** ^^
Genotype × LPS	$F_{2,42} < 1$	$F_{2,42} < 1$
Hour	$F_{23,966} = 2.93$, $p < 0.0001$	$F_{23,966} = 6.65$, $p < 0.0001$
Hour × Genotype	$F_{23,966} < 1$	$F_{23,966} = 1.97$, $p < 0.01$
Hour × LPS	$F_{46,966} = 5.22$, $p < 0.0001$	$F_{46,966} = 5.28$, $p < 0.0001$
Hour × Genotype × LPS	$F_{46,966} < 1$	$F_{46,966} = 1.3$, $p > 0.05$

****p* < 0.001 vs физиологический раствор; ^ *p* < 0.05, ^^ *p* < 0.01 vs 0.1 ЛПС.

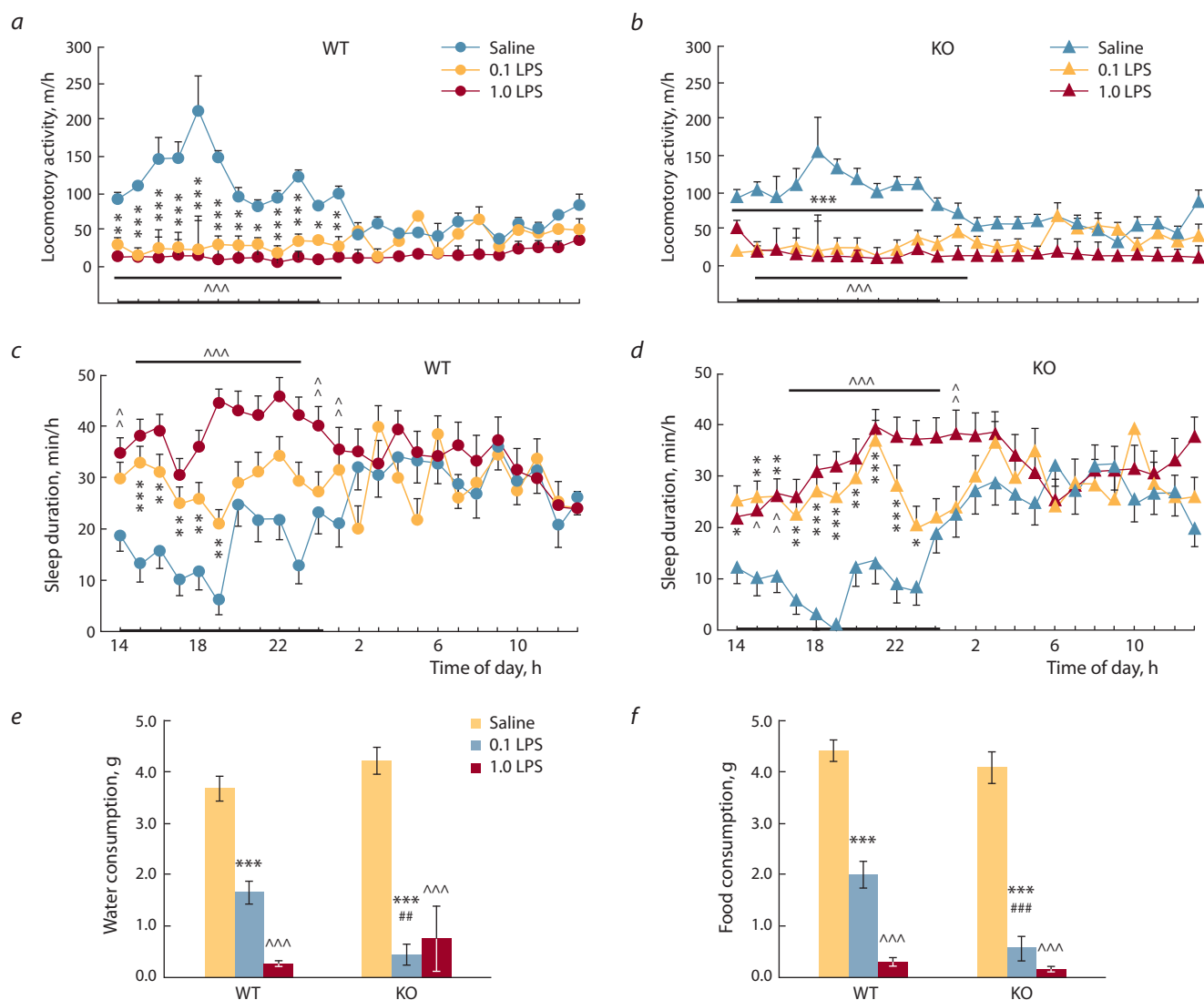


Fig. 2. Effects of saline and LPS treatments on the daily variation of locomotion (a, b) and sleep (c, d) and on daily water (e) and food (f) consumption in WT and KO mice. Each group consisted of eight animals.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ sal vs 0.1 mg/kg of LPS of the same genotype; ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ sal vs 1.0 mg/kg of LPS of the same genotype; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs WT.

сравнению с соответствующими контрольными группами, которым вводили физиологический раствор (рис. 2, а, б).

Обнаружено влияние генотипа и ЛПС, но не их взаимодействия, на продолжительность сна (см. таблицу). Высокая доза ЛПС (1.0 мг/кг) значительно увеличивает продолжительность сна у мышей WT и KO в течение 12 ч после введения. В то же время низкая доза ЛПС (0.1 мг/кг) увеличивает время сна в течение 6 ч у мышей группы WT и в течение 10 ч у мышей KO (см. рис. 2, в, г).

Было продемонстрировано отсутствие значимого влияния генотипа на дневное потребление воды ($F_{1,42} < 1$). В то же время ЛПС ($F_{2,42} = 69.29$, $p < 0.0001$) и взаимодействие генотип $\times$ ЛПС ($F_{2,42} = 4.96$, $p < 0.01$) оказывали существенное влияние на этот признак. Факторы генотип ($F_{1,42} = 13.19$, $p < 0.001$), ЛПС ($F_{2,42} = 201.3$, $p < 0.0001$) и взаимодействия генотип $\times$ ЛПС ($F_{2,42} = 5.73$, $p < 0.01$) влияют на потребление пищи. Высокая доза ЛПС вызывала резкое сокращение потребления воды и пищи у животных

обоих генотипов, в то время как низкая доза ЛПС приводила к более заметному снижению этих признаков у животных KO по сравнению с мышами WT (см. рис. 2, д, е).

Обсуждение результатов

Интактные мыши обеих линий больше двигаются и меньше времени проводят во сне в темный период суток. Это соответствует наблюдениям других авторов и обусловлено тем, что мыши – сумеречные и ночные животные, и светлое время проводят в укрытиях. Мы не обнаружили различий по средним значениям двигательной активности и продолжительности сна за один час между мышами WT и KO. Однако динамика суточной активности у мышей данных линий различается, о чем свидетельствует значимый вклад взаимодействия генотип $\times$ время суток в изменчивость двигательной активности и времени сна. Действительно, в темный период мыши KO менее активны и меньше времени проводили во сне по сравнению с

животными WT, тогда как в светлое время суток различий по данным показателям между мышами обеих линий выявлено не было. В течение суток интактные мыши КО потребляют меньше пищи и воды по сравнению с мышами WT. Иными словами, в домашней клетке общая активность, включающая двигательную активность и потребление пищи, у мышей с нокаутом гена *Zbtb33* несколько снижена по сравнению с животными дикого типа.

Полученный результат контрастирует с ранее опубликованными данными, демонстрирующими более высокую локомоторную активность животных КО в тесте «открытое поле» (Коростина, Куликов, 2015; Kulikov et al., 2016). Однако в упомянутом эксперименте двигательная активность была измерена в течение короткого промежутка (5 мин) и в светлое время, когда активность животных минимальна и, как показано в настоящей работе, не различается у мышей этих линий. Кроме того, в тесте «открытое поле» животное помещают в незнакомую ему обстановку, и оно находится под воздействием двух противоположных мотиваций: стремится исследовать незнакомую территорию и одновременно испытывает страх, который может подавлять двигательную активность и вызывать реакцию замирания. Действительно, в более ранних работах было показано, что в тесте «открытое поле» мыши КО испытывают меньше страха и больше времени проводят в центре арены по сравнению с животными WT (Коростина, Куликов, 2015; Kulikov et al., 2016). Поэтому можно предполагать, что наблюдаемая разница в активности мышей в тесте «открытое поле» обусловлена снижением активности животных WT из-за их повышенной чувствительности к стрессу, вызванному помещением в новую обстановку.

Было показано снижение двигательной активности у мышей, гетерозиготных по нокауту гена *Mecp2*, кодирующего одноименный белок, который, как и Kaiso, связывается с метилированными цитозинами в молекуле ДНК и вызывает репрессию генов (Kondo et al., 2008; Jiang et al., 2011). Это сходство в действии нокаутов генов *Zbtb33* и *Mecp2* на общую двигательную активность свидетельствует об участии метилирования ДНК в регуляции данного признака. В данной работе мы впервые показали влияние нокаута гена *Zbtb33* на динамику сна и потребление пищи и воды.

Острое введение ЛПС вызывает «синдром поведения больного» (sickness syndrome), сопровождающийся продолжительным снижением двигательной активности, сонливостью и анорексией (Dantzer, 2009). Действительно, ЛПС приводил к дозозависимому снижению двигательной активности и увеличению времени сна у мышей обоих генотипов по сравнению с соответствующими контрольными животными, которым вводили физиологический раствор. Двигательная активность у мышей, которым вводили ЛПС, вне зависимости от дозы токсина у обеих линий была ниже таковой у соответствующих контролей в течение всего темного периода, когда эти животные особенно активны.

Нокаут гена *Zbtb33* модифицировал действие маленькой дозы ЛПС на продолжительность сна. Об этом свидетельствует статистически значимое значение взаимодействия генотип $\times$ время. Маленькая доза токсина повышала время сна в течение 5 ч у животных WT и 10 ч у мышей КО.

Однако большая доза ЛПС вызывала повышенную сонливость у мышей обоих генотипов по сравнению с соответствующим контролем в течение всего темного периода.

Интактные мыши КО потребляли меньше пищи и воды по сравнению с животными WT. В то же время мы не выявили межлинейных различий в этих показателях у мышей, которым вводили физиологический раствор. Этому видимому противоречию есть два объяснения. Во-первых, в двух группах интактных мышей было втрое больше животных (по 24 особи), чем в двух группах животных, получавших физиологический раствор (по 8 особей). Во-вторых, введение физиологического раствора является стрессом, который может изменить поведение животных. Важнейший результат нашей работы – демонстрация эффекта взаимодействия генотип $\times$ ЛПС на суточное потребление пищи и воды. Введение малой дозы ЛПС (0.1 мг/кг) сильнее подавляло потребление пищи и воды у мышей КО по сравнению с WT. Большая доза ЛПС вызывала одинаково глубокое подавление потребления пищи и воды у мышей обоих генотипов.

Полученные результаты свидетельствуют, что мыши группы КО более чувствительны к ЛПС, чем животные WT, по таким характеристикам, как продолжительность сна и потребление пищи и воды. Провоспалительный цитокин IL-1 β является основным медиатором эффекта ЛПС на поведение (Dantzer, 2009). Показано, что метилирование промотора гена *Il1 β* снижает уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина в клетках микроглии мышей C57BL/6 (Matt et al., 2016). Поэтому можно предположить, что отсутствие белка Kaiso у мышей КО затрудняет считывание метилированных участков ДНК в промоторе гена *Il1 β* и увеличивает экспрессию данного цитокина в ответ на введение ЛПС. Этот гипотетический механизм может лежать в основе повышенной чувствительности мышей КО к ЛПС.

Ранее было показано, что нокаут гена *Zbtb33* снижает риск развития рака кишечника (Prokhortchouk et al., 2006), увеличивает двигательную активность и снижает тревожность в тесте «открытое поле» (Kulikov et al., 2016) и оказывает выраженный антидепрессантный эффект в тесте «принудительное плавание» (Коростина, Куликов, 2015). Принимая во внимание эти многочисленные «выгоды» дефицита гена Kaiso, мы задаемся закономерным вопросом: почему данный ген не был элиминирован естественным отбором в ходе эволюции? Прежде всего следует учитывать, что условия в тестах «открытое поле» и «принудительное плавание» искусственные и редко встречаются в жизни животного в природе (нормальное животное постарается избежать подобных ситуаций). В то же время для понимания роли белка Kaiso необходимо проанализировать эффекты его дефицита на рутинные реакции животного – суточную активность, сон, потребление пищи, устойчивость к стрессу и инфекциям. В проведенном исследовании впервые выявлены такие негативные эффекты дефицита Kaiso, как снижение двигательной активности, продолжительности сна, потребления пищи и воды, а также повышенная реакция на токсин (ЛПС). Эти негативные эффекты служат экспериментальным доказательством важности белка Kaiso для нормальной жизни мышей.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0002 and the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-00266. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bali P., Im H.I., Kenny P.J. Methylation, memory and addiction. *Epi-genetics*. 2011;6:671-674.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
- Bogdanovic O., Veenstra G.J. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and functions. *Chromosoma*. 2009;118:549-565.
- Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2009;29:247-264.
- Della Ragione F., Tiunova A., Vacca M., Strazzullo M., González E., Armstrong J., Valero R., Campanile C., Pineda M., Hulten M., Monros E., D'Esposito M., Prokhortchouk E. The X-linked methyl binding protein gene *Kaiso* is highly expressed in brain but is not mutated in Rett syndrome patients. *Gene*. 2006;373:83-89.
- Filion G.J., Zhenilo S., Salozhin S., Yamada D., Prokhortchouk E., De-fosse P.A. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:169-181.
- Jiang Y., Matevossian A., Guo Y., Akbarian S. *Setdb1*-mediated histone H3K9 hypermethylation in neurons worsens the neurological phenotype of *Mecp2*-deficient mice. *Neuropharmacology*. 2011;60:1088-1097.
- Klose R.J., Bird A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 2006;31:89-97.
- Kondo M., Gray L.J., Pelka G.J., Christodoulou J., Tam P.P.L., Han-nan A.J. Environmental enrichment ameliorates a motor coordination deficit in a mouse model of Rett syndrome – *Mecp2* gene dosage effects and BDNF expression. *Eur. J. Neurosci.* 2008;27:3342-3350. DOI 10.1111/j.1460-9568.2008.06305.x.
- Korostina V.S., Kulikov A.V. Behavioral phenotyping of *Kaiso*-deficient mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):399-403. DOI 10.18699/VJ15.051. (in Russian)
- Kulikov A.V., Korostina V.S., Kulikova E.A., Fursenko D.V., Akulov A.E., Moshkin M.P., Prokhortchouk E.B. Knockout *Zbtb33* gene results in an increased locomotion, exploration and pre-pulse inhibition in mice. *Behav. Brain Res.* 2016;297:76-83.
- Lubin F.D., Gupta S., Parrish R.R., Grissom N.M., Davis R.L. Epigenetic mechanisms: critical contributors to long-term memory formation. *Neuroscientist*. 2011;17:616-632.
- Matt S.M., Lawson M.A., Johnson R.W. Aging and peripheral lipopolysaccharide can modulate epigenetic regulators and decrease IL-1 β promoter DNA methylation in microglia. *Neurobiol. Aging*. 2016;47:1-9.
- Prokhortchouk A., Sansom O., Selfridge J., Caballero I.M., Salozhin S., Aithozhina D., Cerchietti L., Meng F.G., Augenlicht L.H., Mariadason J.M., Hendrich B., Melnick A., Prokhortchouk E., Clarke A., Bird A. *Kaiso*-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:199-208.
- Shumskaya V.S., Zhigalova N.A., Prokhorchouk A.V., Prokhorchouk E.B. Distribution of *Kaiso* protein in mouse tissues. *Histochem. Cell Biol.* 2015;143(1):29-43.
- Wade P.A. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays*. 2001;23:1131-1137.

Сравнение преимплантационного развития эмбрионов крыс линий OXYS и WAG в условиях *in vivo* и *in vitro*

В.В. Кожевникова^{1,2}, Т.Н. Игонина¹, Е.Ю. Брусенцев¹, В.И. Мокроусова^{1,2}, Е.А. Кизилова^{1,2}, И.Н. Рожкова¹, В.А. Напримеров^{1,3}, С.Я. Амстиславский¹ 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Линия крыс OXYS является моделью преждевременного старения. Ранее были проведены многочисленные исследования, направленные на изучение особенностей поведения и физиологии крыс этой линии в период постнатальной жизни, однако преимплантационное развитие эмбрионов линии OXYS до сих пор не изучено. В настоящей работе исследовано преимплантационное развитие эмбрионов крыс линии OXYS как в условиях *in vivo*, так и при культивировании *in vitro*. В качестве контроля для всех экспериментов служила линия крыс WAG. Для исследования преимплантационного развития *in vivo* у крыс линий OXYS и WAG на 5-й день беременности из репродуктивных путей извлекали эмбрионы. У эмбрионов оценивали стадию развития и долю зародышей, достигших стадии бластоцисты, подсчитывали число клеток, входящих в состав бластоцисты. При изучении особенностей культивирования в условиях *in vitro* эмбрионы двух линий крыс извлекали из репродуктивных путей на сутки раньше, на 4-й день беременности, на стадии дробления эмбрионов. Такие эмбрионы, состоящие всего из восьми blastomeres на данной стадии развития, культивировали *in vitro* в течение 48 ч в среде P1 в присутствии ростового фактора IGF-1 (200 нг/мл) либо без него. После культивирования у эмбрионов крыс так же, как и в эксперименте по оценке развития эмбрионов *in vivo*, подсчитывали долю зародышей, достигших стадии бластоцисты, и оценивали число клеток, представленных в бластоцисте. В статье показано, что на 5-е сутки развития в репродуктивных путях самок крыс линии OXYS представлено большее число эмбрионов по сравнению с линией WAG. Развившиеся в условиях *in vivo* бластоцисты крыс линии OXYS на 5-е сутки содержат меньшее число клеток по сравнению с эмбрионами линии WAG. Культивирование ранних эмбрионов крыс линии OXYS и WAG в среде P1 нивелирует различия в скорости развития между этими линиями, а присутствие IGF-1 в культуральной среде не оказывает ни положительного, ни отрицательного эффекта на их развитие в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: крысы OXYS; крысы WAG; преимплантационное развитие *in vivo*; культивирование *in vitro*; эмбрионы; IGF-1.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кожевникова В.В., Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю., Мокроусова В.И., Кизилова Е.А., Рожкова И.Н., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Сравнение преимплантационного развития эмбрионов крыс линий OXYS и WAG в условиях *in vivo* и *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(7):810-815. DOI 10.18699/VJ17.300

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kozhevnikova V.V., Igonina T.N., Brusentsev E.Yu., Mokrousova V.I., Kizilova E.A., Rozhkova I.N., Naprimerov V.A., Amstislavsky S.Ya. Comparison of *in vivo* and *in vitro* preimplantation embryo development in OXYS and WAG rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):810-815. DOI 10.18699/VJ17.300 (in Russian)

Comparison of *in vivo* and *in vitro* preimplantation embryo development in OXYS and WAG rats

V.V. Kozhevnikova^{1,2}, T.N. Igonina¹, E.Yu. Brusentsev¹, V.I. Mokrousova^{1,2}, E.A. Kizilova^{1,2}, I.N. Rozhkova¹, V.A. Naprimerov^{1,3}, S.Ya. Amstislavsky¹ 

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

OXYS rats are the model of precocious senescence. Numerous studies addressed physiology and behavior in rats of this strain during a postnatal period of their life, however, preimplantation development in OXYS rats has not yet been investigated. This study is addressing preimplantation embryonic development in OXYS rats both *in vivo* and *in vitro*. Rats of the WAG strain were used as controls. For studying the *in vivo* development, the embryos were collected from OXYS and WAG rats on day 5 post coitum, the stages of embryo development were estimated, the percentage of embryos at blastocyst stage and the cell numbers in these blastocysts were counted. In a special experiment, for studying *in vitro* development, the embryos were collected from both rat strains on day 4 post coitum and were cultured *in vitro* in P1 medium for 48 hours with or without supplementation with IGF-1 (200 ng/mL). Thereafter the percentage of embryos at blastocyst stage and the cell numbers in these blastocysts were counted in the same manner as for the *in vivo* experiment. This study reports that *in vivo* derived blastocysts of OXYS rats contain fewer cells on day 5 of their development than *in vivo* derived blastocysts of WAG rats. *In vitro* culture of the early preimplantation embryos in P1 medium mitigated the difference in the rate of embryo development between these two strains, the addition of IGF-1 into culture medium exerts neither negative nor positive effect on the rate of *in vitro* embryo development in rats of both strains.

Key words: OXYS rats; WAG rats; *in vivo* preimplantation development; *in vitro* culture; embryos; IGF-1.

Received 04.08.2017

Accepted for publication 18.10.2017

© AUTHORS, 2017

В настоящее время существует большое разнообразие сред для культивирования эмбрионов млекопитающих. Культуральные среды различаются по своим трофическим добавкам, гормонам и другим компонентам, однако доля развивающихся эмбрионов в условиях *in vitro* чаще всего ниже по сравнению с таковыми в условиях *in vivo*. Такие различия показаны на мышах (Harlow, Quinn, 1982), крысах (Miyoshi et al., 1997) и эмбрионах других млекопитающих (Roth et al., 1994; Khatir et al., 2005). Более того, между полученными в условиях *in vivo* и *in vitro* эмбрионами имеются различия в уровне метилирования ДНК (Horii et al., 2010), потреблении глюкозы и метаболизме аминокислот (Krisher, 2013). Подробнее различия в метаболизме и других параметрах у эмбрионов млекопитающих при их развитии в условиях *in vivo* и *in vitro* проанализированы в обзоре (Брусенцев и др., 2014).

С момента оплодотворения и до имплантации эмбрион развивается в жидкости, которая заполняет яйцеводы и матку, однако в условиях *in vitro* до сих пор не создана уникальная среда, которая бы полностью воспроизводила естественные условия *in utero* (Summers, Biggers, 2003). Этот поиск представляется трудной задачей (Брусенцев и др., 2014), но можно найти отдельные компоненты, которые играют ключевую роль в развитии эмбрионов, чтобы максимально приблизить условия их развития к тем, что имеются *in vivo*.

Открытие роли гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в процессах дробления и имплантации стало настоящим прорывом в культивировании эмбрионов млекопитающих (Robertson, 2007). На основе этих данных для клиник ЭКО создана специальная среда (EmbryoGen, Origio) для эмбрионов с добавлением фактора GM-CSF (Renzini et al., 2013). Инсулиноподобный фактор роста первого типа (IGF-1) также является одним из известных факторов роста, действующих на преимплантационные эмбрионы (Velazquez et al., 2011; Green, Day, 2013). IGF-1 обнаруживают у разных видов животных, он присутствует у мышей (Manabe et al., 2013), крыс (Zhang et al., 1994), коров (Xia et al., 1996), а также в репродуктивных путях человека (Lighten et al., 1998). Экспрессия IGF-1 в репродуктивных путях мышей идет под контролем гормонов яичника, в частности прогестерона и эстрадиола, а повышение уровня экспрессии этого ростового фактора отмечается с 4-го дня после оплодотворения и сохраняется на 5-й–6-й день, т. е. именно в периплантационный период (Karur et al., 1992).

Помимо ключевой роли IGF-1 в регуляции клеточного роста, дифференцировки и апоптоза, этот ростовой фактор задействован в процессах старения у многих организмов, включая круглых червей, дрозофил и млекопитающих (Kenyon, 2001; Berrymann et al., 2008). Известно, что низкий уровень IGF-1, а также нокаут его рецептора в гетерозиготе увеличивают продолжительность жизни у мышей (Holzenberger et al., 2003).

Эффекты IGF-1 продемонстрированы на эмбрионах мышей (Harvey, Kaye, 1992; Heyner et al., 1993; Lin et al., 2003), крупного рогатого скота (Velazquez et al., 2011), человека (Lighten et al., 1998) и домашней кошки (Thongkittidilok et al., 2014), но на крысах подобные исследования не проводились. Несмотря на то что крысы OXYS

являются уникальной моделью старения, существует лишь одна работа, в которой изучено преимплантационное развитие крыс этой линии *in vitro* (Брусенцев и др., 2015). В этой работе показано, что GM-CSF не влияет на скорость развития эмбрионов крыс линии OXYS, но в ней не исследовано влияние на развитие эмбрионов фактора IGF-1, задействованного в процессах старения.

Цель настоящего исследования – изучение преимплантационного развития крыс OXYS *in vivo* и *in vitro* в сравнении с крысами WAG, в том числе при участии фактора роста IGF-1.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок крыс линий WAG и OXYS (возраст 10–14 нед). Для спаривания с целью получения эмбрионов использовали самцов тех же линий того же возраста. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Все эксперименты на животных одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

Получение *in vivo* эмбрионов крыс на стадии бластоцисты. Для сравнения темпов развития эмбрионов у крыс линий WAG и OXYS проанализированы эмбрионы на стадии бластоцисты, полученные в условиях *in vivo*. Для этого половозрелых самок крыс линий WAG (9) и OXYS (7), находящихся в состоянии эструса, который определяли с помощью анализа влагалищных мазков, ссаживали на ночь с самцами соответствующих линий. День обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке считали первым днем беременности. Эмбрионы вымывали через 120 ч после обнаружения сперматозоидов в мазке у крыс. Самок крыс подвергали эвтаназии путем помещения в CO₂-камеру. Эмбрионы получали путем промывания яйцеводов с помощью инсулиновых шприцев с иглой диаметром 0.3 мм со средой FertiCult Flushing medium (FertiPro, Бельгия).

Бластоцисты, полученные *in vivo*, классифицировали в зависимости от размера их полости. Если полость бластоцисты была менее 50 % от всего объема эмбриона, то такие эмбрионы относили к категории 1, если более 50 %, – к категории 2. После оценки эмбрионы фиксировали в 4 % растворе формальдегида (Merk, Германия) и хранили при температуре +4 °C для дальнейшего подсчета ядер в бластоцистах.

Получение эмбрионов крыс на стадии дробления и дальнейшее культивирование *in vitro* в присутствии фактора роста IGF-1. Для эксперимента *in vitro* получали эмбрионы крыс через 96 ч после обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. В работе использованы только восьмиклеточные эмбрионы крыс OXYS и WAG.

Анализ полученных эмбрионов проводили с использованием стереомикроскопа Leica S8 APO (Leica Microsystems, Германия) с увеличением до ×80. Качество эмбрионов оценивали по таким критериям, как стадия эмбрионального развития, целостность блестящей оболочки и число неповрежденных бластомеров.

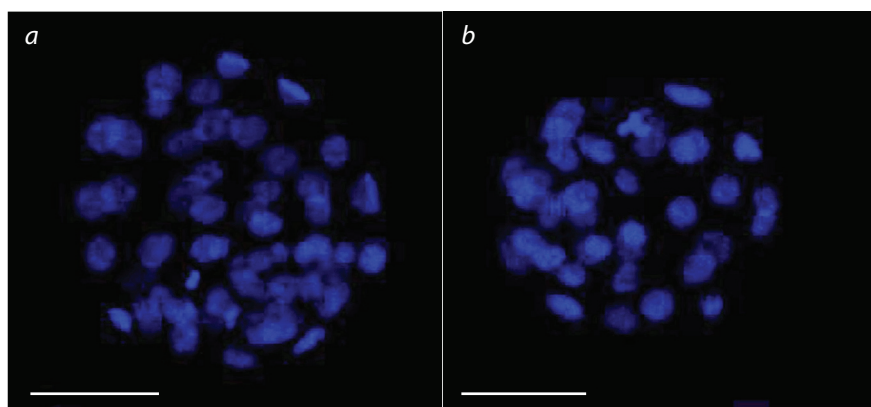


Fig. 1. Blastocysts of WAG and OXYS rats obtained *in vivo* on day 5 of development. Fluorescence microscopy of DAPI-stained rat embryos: (a) WAG strain, (b) OXYS strain. Scale bar 50 μ m.

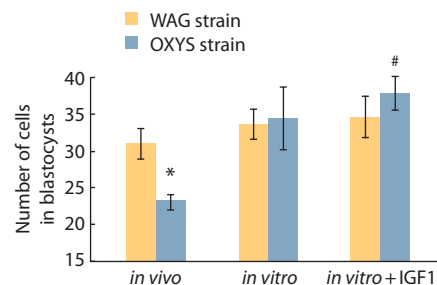


Fig. 2. Number of cells in WAG and OXYS rat blastocysts (regardless of grade) obtained *in vivo* and after *in vitro* culturing, with or without IGF1.

* $p < 0.05$ vs. WAG blastocysts obtained *in vivo*,
$p < 0.05$ vs. OXYS blastocysts obtained *in vivo*.

Полученные эмбрионы промывали в трех каплях среды FertiCult Flushing medium и распределяли по группам (3–5 эмбрионов в 50 мкл питательной среды). Культивирование эмбрионов крыс проводили в каплях среды P1 (Cosmo Bio, США) под минеральным маслом (Sigma, США). Дальнейшее развитие эмбрионов проходило в условиях CO_2 -инкубатора (Galaxy 48R/48S, Eppendorf-MG), при температуре 37 °C, 5 % CO_2 и влажности 90 %. В эксперименте по влиянию факторов роста на крысиные эмбрионы было сформировано четыре группы: эмбрионы крыс линии WAG без добавления фактора (контрольная) и с добавлением IGF-1 (200 нг/мл), а также эмбрионы крыс линии OXYS без добавления фактора (контрольная) и с добавлением IGF-1 (200 нг/мл).

Оценку развития эмбрионов производили каждые 24 ч культивирования, фотодокументирование эмбрионов проводили при $\times 250$ увеличении с использованием микроскопа M205 FA (Leica Microsystems, Германия). По окончании культивирования эмбрионы фиксировали в 4 % растворе формальдегида (Merk, Германия) и хранили при температуре +4 °C для дальнейшего подсчета ядер в бластоцисте.

Окраска интерфазных ядер в клетках преимплантационных эмбрионов. Бластоцисты помещали в 1 мл фосфатно-солевого буфера Дюльбекко (DPBS) (Sigma, США), содержащего 4 % формальдегида (Merk, Германия) при pH 7.4–7.6. После фиксации эмбрионы промывали три раза в 500 мкл DPBS, выдерживали в 0.3 % растворе Triton X-100 в течение 5 мин и подвергали воздействию 2 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma, США) в DPBS в течение 10 мин при комнатной температуре и затем промывали в DPBS. Окрашенные эмбрионы помещали в каплю DPBS на чистое предметное стекло и накрывали покровным стеклом. Стекла с препаратами были проанализированы и подсчитано число клеток с использованием микроскопа M205 FA (Leica Microsystems, Германия) с соответствующими фильтрами для окрашивания DAPI. Подсчет числа ядер в эмбрионе производили вручную путем визуальной оценки препаратов.

Статистический анализ. Результаты по подсчету числа клеток в бластоцистах крыс в зависимости от их категории и анализу общего числа полученных эмбрионов представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Сравнение проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Для анализа данных по числу клеток в бластоцистах без разделения их по категориям использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В качестве факторов использованы «линия» и «условия развития». *Post hoc* анализ осуществляли с помощью критерия Фишера. Проценты эмбрионов, достигающих стадии бластоцисты в разных экспериментальных группах, сравнивали с помощью критерия χ^2 . Статистическую обработку проводили с использованием стандартного пакета программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, Inc). Различия считали достоверно значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Показано, что через 120 ч после обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке в репродуктивных путях крыс линии OXYS присутствует большее число эмбрионов по сравнению с линией WAG: 9.7 ± 0.9 ($n = 7$) и 7.2 ± 0.4 ($n = 9$) соответственно ($p < 0.05$). Доля эмбрионов, достигающих стадии бластоцисты на 5-е сутки развития *in vivo*, не отличается у крыс линий OXYS и WAG (61.8 и 69.8 % соответственно). При этом наблюдаются значительные различия в числе клеток, входящих в состав бластоцист (рис. 1, 2; табл. 1). Влияние факторов «линия» и «условия развития» на этот показатель не было достоверным. *Post hoc* анализ, тем не менее, показал, что эмбрионы крыс линии OXYS на 5-е сутки развития состоят из меньшего числа клеток, чем у крыс линии WAG ($p < 0.05$) (см. рис. 2).

Следует отметить, что такие межлинейные различия проявляются ($p < 0.05$) и при отдельном сравнении числа клеток по второй категории бластоцист (т. е. стадии поздней и экспандированной бластоцисты, стадии хетчинга) (см. табл. 1).

Межлинейные различия по числу клеток, входящих в состав бластоцисты, нивелировались в эксперименте по культивированию дробящихся эмбрионов крыс в условиях *in vitro* в течение 48 ч (см. рис. 2). После культивирования число клеток в бластоцистах крыс линии OXYS не отличалось от такового у крыс линии WAG (34.5 ± 4.2 и 33.7 ± 1.1 соответ-

Table 1. Number of cells in embryos of WAG and OXYS rats obtained *in vivo* on day 5 of pregnancy with regard to blastocyst grade

Strain	Blastocysts		Number of cells in blastocysts	
	Grade 1 (%)	Grade 2 (%)	Grade 1 (number of embryos)	Grade 2 (number of embryos)
WAG	9 (17.0)	28 (52.8)	22.0 ± 1.6 (6)	33.7 ± 1.1 (20)
OXYS	14 (20.6)	28 (41.2)	19.1 ± 0.9 (13)	26.4 ± 1.2 (16)*

* $p < 0.05$ vs. the number of cells in WAG rats in blastocysts of the same grade.

Table 2. Comparison of the growth rate of WAG and OXYS rat embryos *in vitro* and with growth factor IGF1

Group		Number of embryos (number of donor animals)	Blastocyst stage (%)	
			after 24 h	after 48 h
WAG strain	Control	21 (6)	3 (14.3)	7 (33.3)
	200 ng/mL IGF1	16 (4)	4 (25)	6 (37.5)
OXYS strain	Control	28 (7)	0 (0)	13 (46.4)
	200 ng/mL IGF1	14 (4)	2 (14.3)	4 (28.6)

ственно). *Post hoc* анализ показал, что при добавлении фактора IGF-1 при культивировании *in vitro* эмбрионов крыс линии OXYS число клеток в бластоцистах не отличалось от такового при культивировании без фактора, хотя было достоверно больше ($p < 0.05$) по сравнению с эмбрионами той же линии, полученными *in vivo* (см. рис. 2). Более того, доля развивающихся бластоцист при добавлении к дробящимся восьмиклеточным эмбрионам крыс IGF-1 в дозе 200 нг/мл не отличалась от контрольных групп *in vitro* (табл. 2).

Обсуждение

В проведенном нами эксперименте по подсчету клеток в бластоцистах крыс, полученных после пяти дней развития *in vivo*, их число варьировало от 23 до 31, а при развитии *in vitro* (три дня развития *in vivo* плюс два дня развития *in vitro*) составляло 33–38 клеток на эмбрион. Эти результаты не противоречат данным литературы (Schiffner, Spielmann, 1976; Kito et al., 2008; Porova et al., 2011), несмотря на то что культивирование эмбрионов проходило на неспецифической для крыс среде P1, которая по своему составу близка к среде R1ECM, разработанной специально для эмбрионов крыс. По данным литературы, на среде R1ECM при культивировании эмбрионов крыс со стадии двух клеток доля развивающихся бластоцист составляет 32.7 % (Porova et al., 2011), что согласуется с темпами развития эмбрионов крыс в нашем эксперименте, 28.6–46.4 % при культивировании со стадии восьми клеток. Таким образом, коммерческую среду P1, применяемую в клиниках ЭКО для человека, можно также использовать как альтернативу среде R1ECM для культивирования эмбрионов крыс.

В работе (Scott, Whittingham, 1996) указывается, что среди мышей существуют так называемые «медленные» и «быстрые линии»: эмбрионы таких линий демонстрируют различия в темпах эмбрионального развития в условиях

как *in vivo*, так и *in vitro*. Этот же критерий можно применить и по отношению к крысам. Обнаруженные нами межлинейные различия по числу клеток в бластоцистах крыс линий OXYS и WAG, по всей видимости, обусловлены изменениями в маточной жидкости, из которой эмбрионы получают питательные вещества до момента имплантации. Поскольку линия крыс OXYS является моделью раннего старения, а в старении задействованы механизмы с участием фактора роста IGF-1 (Kenyon, 2001; Berryman et al., 2008), мы предположили, что у крыс линии OXYS концентрация этого фактора может быть изменена и за счет этого наблюдается сниженное число клеток в бластоцистах, полученных *in vivo*.

На основе этой гипотезы проведен эксперимент по культивированию *in vitro* восьмиклеточных эмбрионов крыс обеих линий с участием фактора роста IGF-1. Наша гипотеза об измененном уровне данного фактора у крыс OXYS не подтвердилась, поскольку в отсутствие фактора роста IGF-1 после культивирования в течение 48 ч эмбрионы линии OXYS «догнали» по числу клеток линию WAG. Скорее всего, в маточной жидкости у крыс линии OXYS существует нехватка других, более значимых компонентов среды, например аминокислот и белков, поскольку показано, что оптимальные концентрации этих базовых компонентов очень важны для развития эмбрионов млекопитающих (Summers, Biggers, 2003).

В наших экспериментах обнаружено, что потенциальная плодовитость, оцененная по числу эмбрионов, извлеченных из репродуктивных путей, в расчете на самку на 5-й день беременности у крыс линии OXYS выше по сравнению с линией WAG, но после рождения детенышей эти две линии не различаются по числу мышей в помете (Igonina et al., 2017). Это, возможно, связано с более высоким уровнем постимплантационных потерь у крыс OXYS.

В более раннем исследовании (Брусенцев и др., 2015) показано, что добавление GM-CSF в среду при культиви-

ровании *in vitro* приводит к возрастанию доли эмбрионов, достигающих стадии бластоцисты у мышей, однако фактор не оказывает какого-либо влияния на развитие крысинных эмбрионов. В настоящей работе не обнаружено также влияния фактора IGF-1 на развитие преимплантационных эмбрионов крыс *in vitro*.

Предварительный анализ различных доз фактора роста проводился нами в работе с эмбрионами мышей, использовали дозировки 10 и 20 нг/мл. При этом в наших предыдущих исследованиях на мышах влияния этих малых доз IGF-1 на скорость развития эмбрионов *in vitro* не обнаружено, хотя при одиночном культивировании эмбрионов кошек показано, что добавление в культуральную среду IGF-1 в концентрации 25 и 50 нг/мл приводило к увеличению доли эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, тогда как более высокие концентрации IGF-1 не оказывали значимого эффекта (Thongkittidilok et al., 2014). В работе М.А. Velazquez с коллегами (2011) использовали IGF-1 в концентрации 100 и 1000 нг/мл при культивировании эмбрионов крупного рогатого скота. В отличие от более низкой дозы, применение максимальной дозировки приводило к возрастанию числа клеток в ВКМ и в целом в эмбрионах. Выбранная нами достаточно высокая дозировка IGF-1 (200 нг/мл) не оказывала эффекта на эмбрионы крыс. Дальнейший фармакологический анализ с применением других дозровок и систем культивирования позволит окончательно убедиться в том, что IGF-1 не оказывает заметного влияния на темпы развития эмбрионов у крыс.

Отсутствие эффектов и GM-CSF, и IGF-1, по-видимому, может быть связано с особенностями преимплантационного развития у крыс. Возможно, что рецепторы к ростовым факторам появляются у крыс на более поздних стадиях, чем у мышей. Это предположение нуждается в экспериментальной проверке, так как в мировой литературе нам не удалось найти информации по динамике появления рецепторов к этим факторам роста в преимплантационных эмбрионах крыс.

Несмотря на многочисленные исследования влияния IGF-1 на развитие преимплантационных эмбрионов, проведенных главным образом на мышах (Schultz, Heyner, 1993; Брусенцев и др., 2014), его роль в процессах раннего эмбрионального развития неоднозначна. Одни исследователи отмечают его положительные эффекты на процессы дробления и образования бластоцист (Harvey, Kaye, 1992), другие – только на хетчинг (Lin et al., 2003), а некоторые не обнаруживают эффектов вовсе (Green, Day, 2013). По-видимому, такие неоднозначные выводы могут быть обусловлены не только различием дозровок, но и условиями культивирования, поскольку показано, что на экспрессию генов, в том числе и экспрессию рецепторов к IGF-1, может влиять состав среды (Ho et al., 1995).

В настоящей работе впервые изучено развитие эмбрионов крыс линии OXYS как *in vivo*, так и *in vitro*, в том числе и при участии фактора роста IGF-1. Результаты нашего исследования показывают, что эмбрионы крыс линии OXYS в условиях *in vivo* содержат меньшее число клеток на стадии бластоцисты и их можно отнести к «медленной» линии, а линия WAG в сравнении с линией OXYS является «быстрой». Более того, как показали недавние исследо-

вания, крысы OXYS характеризуются сниженным весом в неонатальный период и у них медленнее формируются некоторые рефлексы, свидетельствующие об их замедленном развитии по сравнению с крысами WAG в ходе раннего постнатального онтогенеза (Igonina et al., 2017). Все эти наблюдения подтверждают гипотезу о генетически обусловленном замедлении развития в эмбриональный и ранний неонатальный периоды, что может быть связано с измененным профилем компонентов маточной жидкости, каждый из которых очень важен для развития эмбрионов (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014).

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-05509, and budgeted project 0324-2016-0002 of the Human and Animal Genetics Department, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Berryman D.E., Christiansen J.S., Johannsson G., Thorner M.O., Kopchick J.J. Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: Lessons from animal models. *Growth Horm. IGF Res.* 2008;18(6):455-471. DOI 10.1016/j.ghir.2008.05.005.
- Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Amstislavsky S.Ya. Traditional and modern approaches to culture of preimplantation mammalian embryos *in vitro*. *Ontogenez = Ontogenesis (Moscow)*. 2014;45(2):73-88. (in Russian)
- Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Ragaeva D.S., Amstislavsky S.Ya. Effects of growth factors during *in vitro* culture of mouse and rat embryos. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(4):372-377 DOI 10.18699/VJ15.046. (in Russian)
- Green C.J., Day M.L. Insulin-like growth factor 1 acts as an autocrine factor to improve early embryogenesis *in vitro*. *Int. J. Dev. Biol.* 2013;57(11-12):837-44. DOI 10.1387/ijdb.130044md. PubMed PMID: 24623075.
- Harlow G.M., Quinn P. Development of preimplantation mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. *Aust. J. Biol. Sci.* 1982;35(2):187-193.
- Harvey M.B., Kaye P.L. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 31(3):195-199.
- Heyner S., Shi C.Z., Garside W.T., Smith R.M. Functions of the IGFs in early mammalian development. *Mol. Reprod. Dev.* 1993;35(4): 421-425.
- Ho Y., Wigglesworth K., Eppig J.J., Schultz R.M. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 1995;41: 232-238.
- Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Gélœn A., Even P.C., Cervera P., Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*. 2003;421(6919):182-187.
- Horii T., Yanagisawa E., Kimura M., Morita S., Hatada I. Epigenetic differences between embryonic stem cells generated from blastocysts developed *in vitro* and *in vivo*. *Cell Reprogram.* 2010;12(5):551-563. DOI 10.1089/cell.2009.0104.
- Igonina T.N., Ragaeva D.S., Tikhonova M.A., Petrova O.M., Herbeck Yu.E., Rozhkova I.N., Amstislavskaya T.G., Amstislavsky S.Ya. Neurodevelopment and behavior in neonatal OXYS rats with genetically determined accelerated senescence. *Brain Res.* 2017 (in press).
- Kapur S., Tamada H., Dey S.K., Andrews G.K. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol. Reprod.* 1992;46(2):208-219.

- Kenyon C. A conserved regulatory system for aging. *Cell*. 2001;105(2):165-168.
- Khatir H., Anouassi A., Tibary A. *In vitro* and *in vivo* developmental competence of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos produced *in vitro* using two culture systems (mKSOMaa and oviductal cells). *Reprod. Domest. Anim.* 2005;40(3):245-249.
- Kito S., Kaneko Y., Yano H., Tateno S., Ohta Y. Developmental responses of 2-cell embryos to oxygen tension and bovine serum albumin in Wistar rats. *Exp. Anim.* 2008;57(2):123-128.
- Krisher R.L. *In vivo* and *in vitro* environmental effects on mammalian oocyte quality. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013;1:393-417. DOI 10.1146/annurev-animal-031412-103647.
- Lighten A.D., Moore G.E., Winston R.M., Hardy K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. *Hum. Reprod.* 1998;13(11):3144-3150.
- Lin T.-C., Yen J.-M., Gong K.-B., Hsu T.-T., Chen L.-R. IGF-1/IGFBP-1 increases blastocyst formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the establishment of a stem-cell line. *BMC Cell Biol.* 2003;4:14. DOI 10.1186/1471-21214-14.
- Manabe Y., Tochigi M., Moriwaki A., Takeuchi S., Takahashi S. Insulin-like growth factor 1 mRNA expression in the uterus of streptozotocin-treated diabetic mice. *J. Reprod. Dev.* 2013;59(4):398-404. DOI 10.1262/jrd.2012-169.
- Miyoshi K., Kono T., Niwa K. Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1997;56(1):180-185.
- Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed *in vitro*. *Genes*. 2011;2(2):332-344. DOI 10.3390/genes2020332.
- Renzini M., Dal Canto M., Coticchio G., Comi R., Brigante C., Calliari I., Brambillasca F., Merola M., Lain M., Turchi D. Clinical efficiency and perinatal outcome of ART cycles following embryo culture in the presence of GM-CSF in patients with miscarriage or early pregnancy loss history. *Hum. Reprod.* 2013;28(1):160-202.
- Robertson S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18(3-4):287-298.
- Roth T.L., Swanson W.F., Wildt D.E. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized *in vivo* versus *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1994;51(3):441-451.
- Schiffner J., Spielmann H. Fluorometric assay of the protein content of mouse and rat embryos during preimplantation development. *J. Reprod. Fertil.* 1976;47(1):145-147.
- Schultz G.A., Heyner S. Growth factors in preimplantation mammalian embryos. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 1993;15:43-81.
- Scott L., Whittingham D.G. Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 1996;3(3):336-346.
- Summers M.C., Biggers J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum. Reprod. Update.* 2003;9(6):557-582.
- Thongkittidilok C., Tharasanit T., Sananmuang T. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances developmental competence of cat embryos cultured singly by modulating the expression of its receptor (IGF-1R) and reducing developmental block. *Growth Horm. IGF Res.* 2014;24(2-3):76-82.
- Velazquez M.A., Hermann D., Kues W.A., Niemann H. Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction.* 2011;41(1):91-103. DOI 10.1530/REP-10-0336.
- Xia P., Han V.K., Viuff D., Armstrong D.T., Watson A.J. Expression of insulin-like growth factors in two bovine oviductal cultures employed for embryo co-culture. *J. Endocrinol.* 1996;149:41-53.
- Zhang X., Kidder G.M., Watson A.J., Schultz G.A., Armstrong D.T. Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Reprod. Fertil.* 1994;100(2):375-380.

Связь между фенотипической робастностью и средней продолжительностью жизни у *Drosophila melanogaster*

А.П. Захаренко¹, Д.В. Петровский¹, И.Г. Дранов², С.А. Федорова¹, Н.С. Юдин¹, А.В. Пиндюрин³, Ю.М. Мошкин^{1,3} 

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

² Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Любая долгоживущая система должна быть стабильной, т.е. обладать повышенной устойчивостью как к внешним воздействиям, так и к внутренним сбоям. Робастность биологических систем может быть определена как реципрокная величина к фенотипической изменчивости или, для положительно распределенных признаков, к коэффициенту вариации (C.V.). Рассматривая продолжительность жизни как интегральный фенотип всех функций организма, мы показали, что фенотипическая робастность организма положительно коррелирует с ожидаемой продолжительностью жизни. Мы определили параметры продолжительности жизни для ряда инбредных линий *Drosophila melanogaster*, выращенных при 29 °C, из коллекции Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP). Фенотипическая робастность продолжительности жизни ($C.V.^{-1}$) для этих линий коррелировала положительно с ожидаемой продолжительностью жизни. Соотношение между робастностью и ожидаемой продолжительностью жизни сохраняется и для DGRP линий, выращенных при 25 °C. Помимо этого, в соответствии с ранее опубликованными результатами, с изменением (уменьшением или увеличением) температуры кривые дожития масштабируются (растягиваются или сжимаются соответственно) по временной шкале. Иными словами, с увеличением температуры падает как средняя продолжительность жизни, так и стандартное отклонение от средней продолжительности жизни, в то время как коэффициенты вариации сохраняются в том же диапазоне. Исходя из этого, мы заключили, что коэффициенты вариации коррелируют со средней продолжительностью жизни и отражают фенотипическую робастность продолжительности жизни даже при ускоренном старении, вызванном температурой.

Ключевые слова: продолжительность жизни; ожидаемая продолжительность жизни; старение; фенотипическая изменчивость; фенотипическая робастность; *Drosophila melanogaster*.

A link between phenotypic robustness and life expectancy in *Drosophila melanogaster*

L.P. Zakharenko¹, D.V. Petrovskii¹, I.G. Dranov², S.A. Fedorova¹, N.S. Yudin¹, A.V. Pindyurin³, Y.M. Moshkin^{1,3} 

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

Long-lived systems are expected to be stable, i.e. resistant to either external influences, or internal failures. Robustness of biological systems can be defined as a reciprocal value to their phenotypic plasticity expressed through a coefficient of variation (C.V.) for positively distributed phenotypic traits. Considering lifespan as phenotype, which integrates all functions of an organism, we showed that its phenotypic robustness correlates positively with life expectancy. We assessed lifespan parameters for a selection of inbred *Drosophila melanogaster* strains from Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP) reared at 29 °C. The robustness of lifespan phenotype ($C.V.^{-1}$) correlated positively with estimated life expectancy for these strains. The same relation also holds for the lifespan of all DGRP strains reared at 25 °C. Also, in agreement with previous observations, upon temperature change (decrease or increase) the survival curves scaled in time (stretched or shrunk respectively). In other words, the average lifespan decreased for flies reared at elevated temperature, but so did the standard deviation, and thus the coefficients of variation remained in the same range. From this we conclude that coefficients of variation correlate with life expectancies and account for the robustness of lifespan phenotype irrespective of accelerated aging caused by temperature.

Key words: lifespan; life expectancy; aging; phenotypic plasticity; phenotypic robustness; *Drosophila melanogaster*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Захаренко Л.П., Петровский Д.В., Дранов И.Г., Федорова С.А., Юдин Н.С., Пиндюрин А.В., Мошкин Ю.М. Связь между фенотипической робастностью и средней продолжительностью жизни у *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):816-824. DOI 10.18699/VJ17.301

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zakharenko L.P., Petrovskii D.V., Dranov I.G., Fedorova S.A., Yudin N.S., Pindyurin A.V., Moshkin Y.M. A link between phenotypic robustness and life expectancy in *Drosophila melanogaster*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):816-824. DOI 10.18699/VJ17.301 (in Russian)

Received 06.10.2017

Accepted for publication 27.10.2017

© AUTHORS, 2017

L.P. Zakharenko and D.V. Petrovskii equal contribution to manuscript preparation.

 e-mail: yury.moshkin@gmail.com

Ожидаемая продолжительность жизни, как и множество других фенотипических признаков, зависит от взаимодействия генотипа со средой. Так, мутации в ряде генов, контролирующих метаболизм, рост, упаковку ДНК в хроматин, репарацию ДНК и т.д., могут приводить к ощутимым изменениям в средней продолжительности жизни (Kenyon et al., 1993; Ayudadevara et al., 2008; Garinis et al., 2008; Zane et al., 2014; Ivanov et al., 2015; Proshkina et al., 2015; Pan, Finkel, 2017; Van Raamsdonk, 2017). Очевидно, что генетика старения представляет собой обширную область исследований, и на данный момент уже известно порядка 900/200/100 генов (<http://genomics.senescence.info>), отвечающих за увеличение или уменьшение продолжительности жизни, у нематод (*Caenorhabditis elegans*), мух (*Drosophila melanogaster*) и мышей (*Mus musculus*) соответственно (Tacutu et al., 2013). Среди средовых факторов, влияющих на продолжительность жизни, одними из наиболее часто рассматриваемых являются диета, суточные ритмы и др. (Mair et al., 2003; Lopez-Otin et al., 2016; Vermeij et al., 2016; Kapahi et al., 2017; Rogina, 2017). Помимо этого, для пойкилотермных животных существенное влияние на продолжительность жизни оказывает температура, с увеличением которой, как правило, уменьшается средняя продолжительность жизни (Shaw, Bercaw, 1962). Наконец, при сравнении ожидаемой продолжительности жизни для различных видов животных выявляется ряд универсальных аллометрических зависимостей. Так, ожидаемая продолжительность жизни растет с увеличением видовых размеров и уменьшением скорости основного метаболизма на единицу массы (Speakman, 2005; Hulbert et al., 2007).

Будучи количественным фенотипическим признаком, продолжительность жизни может быть описана некоторой функцией распределения плотности вероятности $f(t)$ (probability density function, PDF) с параметрами $\theta = (\theta_1 = \mu, \theta_2 = \sigma, \dots, \theta_k)$, где μ и σ – ожидаемая продолжительность жизни и стандартное отклонение соответственно. При этом тип и параметры распределения $f(t)$ будут зависеть от функции силы смертности $h(t)$, описывающей риск смерти в интервале возраста $[t, (t+\Delta t)]$. Сила смертности связана с функцией дожития $S(t)$, т.е. с вероятностью дожития до времени t , как $S(t) = \mathbb{P}(T \geq t) = \exp\left[\int_0^t h(x)dx\right]$, и с PDF, как $f(t) = h(t) \cdot S(t)$. При этом $S(t) = 1 - F(t)$, где $F(t) = \mathbb{P}(T \leq t)$ – функция распределения продолжительности жизни (cumulative distribution function, CDF) (Moore, 2016). Таким образом, зная закон, определяющий силу смертности $h(t)$, можно вывести функцию дожития $S(t)$.

Исходя из эмпирических наблюдений, Б. Гомпертц предположил, что вероятность смерти возрастает экспоненциально с возрастом: $h(t) = a \cdot \exp\left[\frac{t}{\beta}\right]$ или в параметризации Гумбеля: $h(t) = \frac{1}{\beta} \cdot \exp\left[\frac{t-\tau}{\beta}\right]$ (Gompertz, 1825; Greenwood, 1928; Gumbel, 1958; Missov et al., 2015). При этом функция дожития принимает следующий вид: $S(t) = \exp\left[-\exp\left(\frac{t-\tau}{\beta}\right)\right]$ (рис. 1, а). Помимо этого, возможны и другие законы, определяющие изменения в силе смертности с возрастом $h(t)$ (Moore, 2016). Следует, одна-

ко, отметить, что в большинстве, если не во всех, случаях, касающихся биологии старения, функции $h(t)$ и $S(t)$ неизвестны. Тем не менее их можно определить из аппроксимации экспериментальных данных методами обобщенной регрессии, применяя распределения Гомпертца/Гумбеля, либо ряд других распределений (Moore, 2016). Помимо прочего, непараметрические подходы, как, например, метод Каплана–Мейера, также позволяют оценить функцию дожития $\hat{S}(t)$ и основные параметры продолжительности жизни μ и σ (Kaplan, Meier, 1958).

Как правило, при анализе эффектов тех или иных факторов на процессы старения в центре внимания оказывается ожидаемая продолжительность жизни $E(T) = \mu$. Однако если посмотреть на функцию дожития, то сразу видно, что другим немаловажным параметром является и крутизна кривых $S(t)$, заданная коэффициентом β для распределения Гумбеля (см. рис. 1, а), что в равной степени представляет интерес для понимания процессов старения (Stroustrup et al., 2016). Очевидна также и прямая связь между крутизной функции дожития и среднеквадратичным отклонением (σ) в продолжительности жизни (см. Материалы и методы, рис. 1, а). Рассматривая саму продолжительность жизни как фенотипический признак, нетрудно заметить, что σ отражает не что иное, как величину изменчивости данного фенотипа при заданном генотипе.

Для положительно распределенных признаков, таких как время жизни, имеет смысл выражать фенотипическую изменчивость через коэффициент вариации ($C.V. = \sigma/\mu$), т.е. как относительное среднеквадратичное отклонение от ожидаемой продолжительности жизни. В отличие от σ $C.V.$ показывает крутизну кривых дожития в координатах, нормализованных на ожидаемую продолжительность жизни (см. Материалы и методы, рис. 1, б) (Markov et al., 2016). Обратная величина $C.V.^{-1} = SNR = \mu/\sigma$ соответствует в техническом смысле соотношению сигнала к шуму (signal to noise ratio), а в биологическом – фенотипической робастности.

Мы предположили, что увеличение ожидаемой продолжительности жизни может быть обусловлено повышенной фенотипической робастностью организма. В качестве интегрального фенотипического признака, зависящего от всех функций организма, мы рассмотрели саму же продолжительность жизни. Наши результаты показывают, что средняя продолжительность жизни (μ) и фенотипическая робастность продолжительности жизни ($C.V.^{-1}$) коррелированы положительно, что подтверждает гипотезу.

Материалы и методы

Математический анализ продолжительности жизни. Распределение Гумбеля задается двумя параметрами: коэффициентом сдвига τ (location) и масштаба β (scale): $f(t) = \frac{1}{\beta} \cdot \exp\left[\frac{t-\tau}{\beta}\right] \cdot \exp\left(-\frac{t-\tau}{\beta}\right)$ (см. рис. 1, а) (Gumbel, 1958; Missov et al., 2015).

Ожидаемая продолжительность жизни (μ) и стандартное отклонение (σ) определяются, как $\mu = \tau - \gamma \cdot \beta$, и среднеквадратичное отклонение, как $\sigma = \frac{\pi \cdot \beta}{\sqrt{6}}$, где $\gamma = 0.57721$ (постоянная Эйлера – Маскерони). Параметр τ соответствует моде продолжительности жизни и β , а значит,

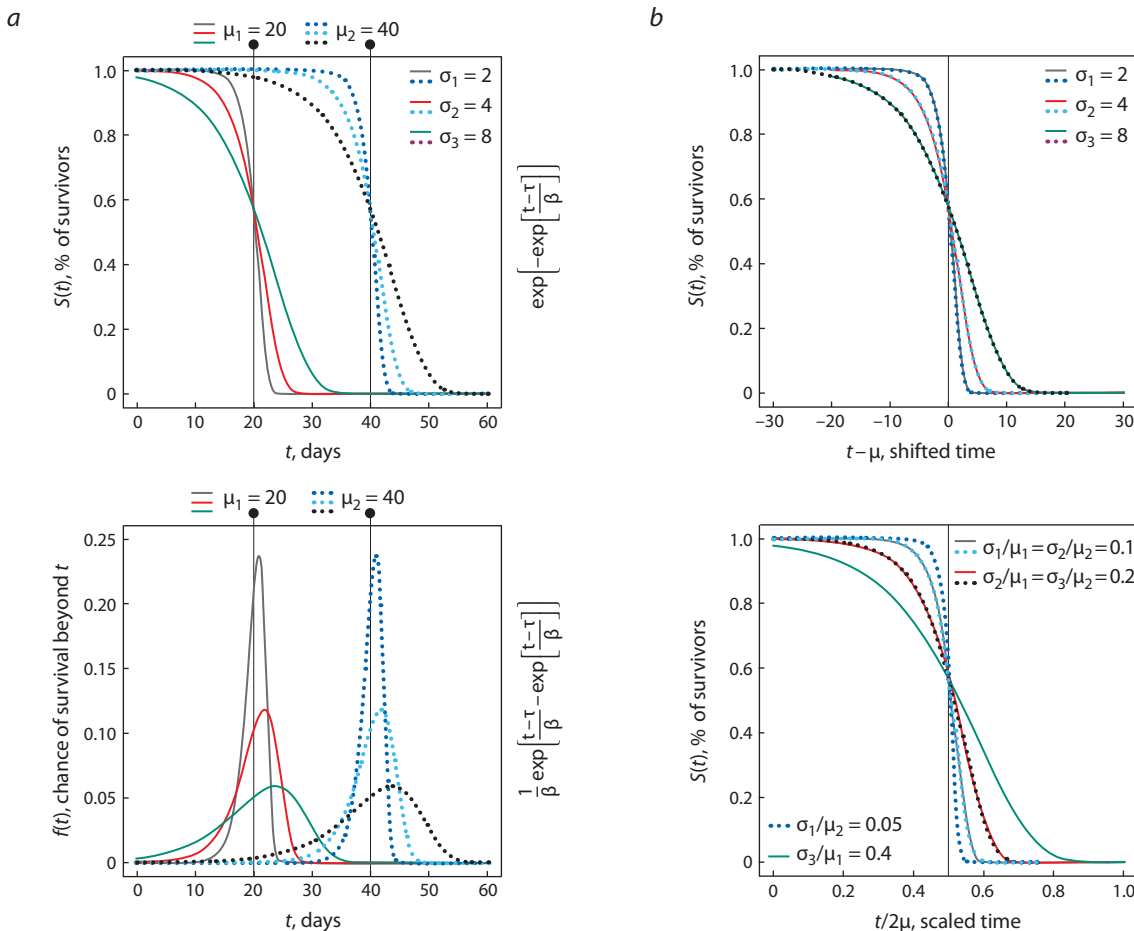


Fig. 1. Parametric modeling of lifespan.

(a) The survival function $S(t)$ expresses the probability of survival beyond time t . It is related to the distribution function $F(t)$ and to the probability density function $f(t)$ as $S(t) = \mathbb{P}(T \geq t) = 1 - F(t) = \int_t^\infty f(x)dx$. Functions $S(t)$ and $f(t)$ of the Gumbel distribution are shown as an example; (b) Standard deviation (σ) from life expectancy defines the steepness of the survival function in the absolute time scale, which is evident from a comparison of mean-centered ($t - \mu$) survival curves. The coefficient of variation ($C.V. = \sigma/\mu$) defines the steepness of the survival function in the mean-normalized ($t/2\mu$) time scale.

и σ – крутизне функции дожития: $S(t) = \exp\left[-\exp\left(\frac{t-\tau}{\beta}\right)\right]$

(см. рис. 1, а). При этом $C.V. = \frac{\sigma}{\mu} = \frac{\pi}{\sqrt{6}} \cdot \left(\frac{\beta}{\tau - \gamma \cdot \beta}\right)$

и $SNR = C.V.^{-1} = \frac{\mu}{\sigma} = \frac{\sqrt{6}}{\pi} \cdot \left(\frac{\tau - \gamma \cdot \beta}{\beta}\right)$.

При масштабировании $S(t)$ на среднюю продолжительность жизни $S(t/\mu) = \exp\left[-\exp\left(\frac{t/\mu - \tau_{\text{norm}}}{\beta/\mu}\right)\right]$, где $\tau_{\text{norm}} = \tau/\mu$,

крутизна кривых дожития приводится к $C.V.$ При равенстве $C.V.$ для двух различных функций дожития, $S_1(t|\tau_1, \beta_1)$ и $S_2(t|\tau_2, \beta_2)$, имеет место следующее соотношение:

$S_1(t|\tau_1, \beta_1) = S_2\left[\frac{\tau_2}{\tau_1} \cdot t|\tau_2, \beta_2\right] = S_2\left[\frac{\mu_2}{\mu_1} \cdot t|\tau_2, \beta_2\right]$. Действительно,

если $\frac{\sigma_1}{\mu_1} = \frac{\sigma_2}{\mu_2}$, то $\frac{\beta_1}{\tau_1} = \frac{\beta_2}{\tau_2}$ и $\beta_1 = \frac{\tau_1}{\tau_2} \cdot \beta_2$. Отсюда

$S_2\left[\frac{\tau_2}{\tau_1} \cdot t|\tau_2, \beta_2\right] = \exp\left[-\exp\left(\frac{(\tau_2/\tau_1) \cdot t - \tau_2}{\beta_2}\right)\right] =$
 $= \exp\left[-\exp\left(\frac{t - \tau_1}{(\tau_1/\tau_2) \cdot \beta_2}\right)\right] = \exp\left[-\exp\left(\frac{t - \tau_1}{\beta_1}\right)\right] = S_1(t|\tau_1, \beta_1)$.

Таким образом, при равенстве $C.V.$ в нормализованных координатах времени две функции дожития равны (см. рис. 1, б). Подобное явление наблюдается у нематод (*Caenorhabditis elegans*), когда при увеличении температуры крутизна кривых дожития (β) увеличивается пропорционально падению средней продолжительности жизни при сохранении равенства $C.V.$ (Stroustrup et al., 2016).

Для определения параметров кривых дожития из экспериментальных данных использовали следующие пакеты языка программирования R: *survival* для непараметрической оценки методом Каплана–Мейера (Kaplan, Meier, 1958; Therneau, Grambsch, 2000) и *gamlss* для параметрической оценки $S(t)$ Гумбеля (Rigby, Stasinopoulos, 2005; Stasinopoulos, Rigby, 2007).

GAMLSS (Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape) представляет собой подход, расширяющий обобщенный регрессионный анализ (Generalized Linear Modelling), который позволяет оценить эффекты интересующих факторов не только на средние значения, но и на целый ряд других параметров распределения (масштаб, форма и т. д.). В общем случае, если случайная

величина (время смерти) распределена как $Y \sim D(\theta)$, где D – некоторое распределение с параметрами $\theta = (\theta_1 = \mu, \theta_2 = \sigma, \dots, \theta_k)$, то общая модель GAMLSS задается как:

$$g_1(\mu) = \eta_1 = X_1 \cdot \alpha_1 + Z_1 \cdot \omega_1,$$

$$g_2(\sigma) = \eta_2 = X_2 \cdot \alpha_2 + Z_2 \cdot \omega_2,$$

$$g_k(\theta_k) = \eta_k = X_k \cdot \alpha_k + Z_k \cdot \omega_k,$$

где g_k – «линкерная» функция ($x, \ln(x), 1/x$, и т.д.); X_k – регрессорная матрица фиксированных эффектов; Z_k – регрессорная матрица случайных эффектов; α_k и ω_k – коэффициенты модели, устанавливаемые для параметра θ_k (Rigby, Stasinopoulos, 2005; Stasinopoulos, Rigby, 2007).

Экспериментальный анализ продолжительности жизни. Длительность жизни определена для 12 секвенированных инбредных линий *Drosophila melanogaster* дикого типа из *Drosophila* Genetic Reference Panel (DGRP), выделенных из популяции Raleigh, North Carolina (коллекция Bloomington *Drosophila* Stock Centre): DGRP-93, DGRP-229, DGRP-370, DGRP-630, DGRP-653, DGRP-761, DGRP-787, DGRP-790, DGRP-812, DGRP-822, DGRP-850, DGRP-900 (Mackay et al., 2012; Huang et al., 2014). Для этого в каждую пробирку с кормом на кукурузной крупе без изюма помещали 20 двухдневных девственных самок или самцов. Всего в анализ было взято 100 самок и 100 самцов каждой линии. Эксперимент проводили при 29 °C, меняя корм на свежий каждые три дня. Число погибших особей подсчитывали каждые три дня. Данные по продолжитель-

ности жизни для линий DGRP, выращенных при 25 °C, доступны из литературы (Ivanov et al., 2015). Кривые дожития Гумбеля для DGRP линий, выращенных при 25 °C, были восстановлены из опубликованных параметров $\hat{\mu}$ и $\hat{\sigma}$ (Ivanov et al., 2015).

Результаты и обсуждение

Для оценки отношений между такими параметрами продолжительности жизни, как μ , σ и $C.V.$, мы проанализировали длительность жизни для 12 секвенированных инбредных линий DGRP *D. melanogaster* (Mackay et al., 2012), выращенных при 29 °C. Аппроксимация кривых дожития по функциям $S(t)$ распределений Гумбеля (GU), Вейбулла (WEI), Гамма (Г), логнормального (LNO) и обратного распределения Гаусса (IG) показала, что распределение Гумбеля наилучшим образом описывает экспериментальные данные (рис. 2, а). Действительно, значения логарифмической функции правдоподобия для модели $S_{GU}(t)$, построенной по распределению Гумбеля, превосходит таковые для других моделей: $l_{GU} = -7399.6 > l_{WEI} = -7610.8 > l_I = -8013.91 > l_{LNO} = -8230.04 > l_{IG} = -8293.09$. Помимо этого, параметрические оценки средней продолжительности жизни и среднеквадратичного отклонения хорошо совпадают с непараметрическими, определенными методом Каплана–Мейера (см. рис. 2, б, в).

Анализ кривых дожития $S(t)$ для самок и самцов, выращенных при 29 °C, выявил широкий разброс по средней

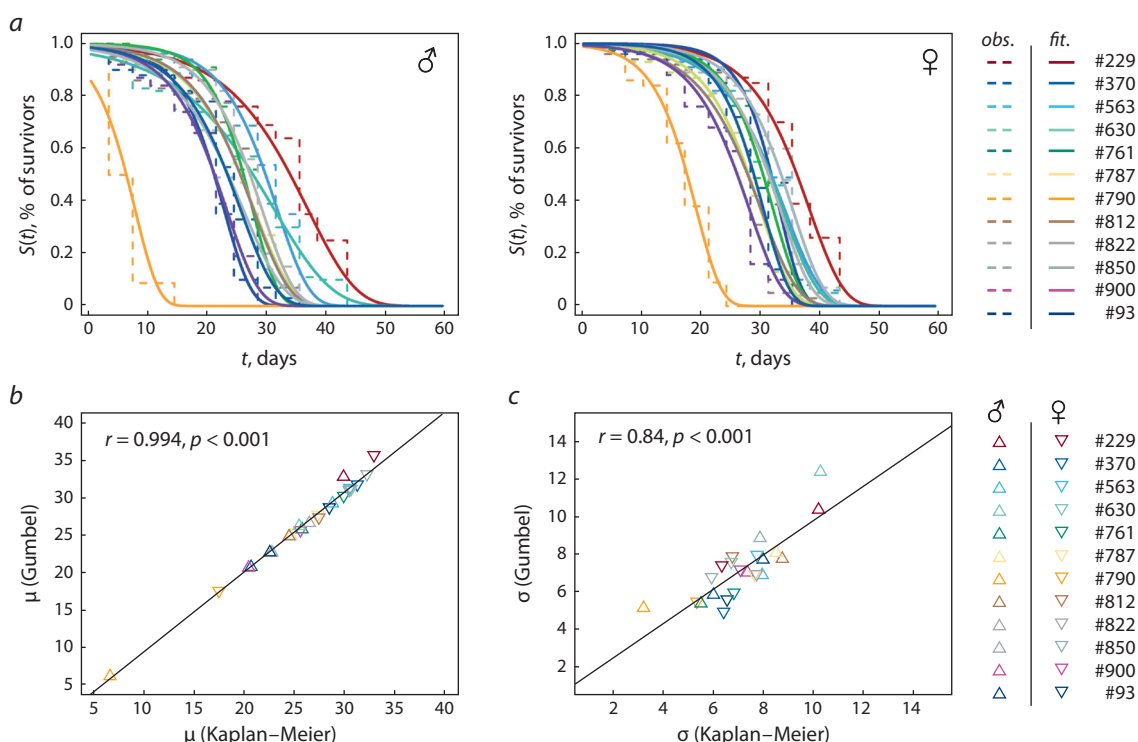


Fig. 2. Parametric analysis of lifespan in inbred DGRP *Drosophila melanogaster* strains.

(a) Experimental (obs, dashed lines) and modeled (fit, solid lines) survival curves constructed for males (left) and females (right) of Genetic Reference Panel *D. melanogaster* lines (DGRP: #93, #229, #370, #563, #630, #761, #787, #790, #812, #822, #850, #900) grown at 29 °C. The survival curves were modeled with the survival function $S(t)$ for the Gumbel distribution. The modeled survival curves are in good agreement with the experimental ones ($R^2 = 0.98$). (b, c) Lifespan parameters determined with the Gumbel parametric model and nonparametric Kaplan–Meier estimator are in good agreement: (b) mean, (c) standard deviation.

Impacts of genotype and nonrelevant experimental fluctuations on the μ and σ parameters of the survival function

Sex	Model ^a	μ	σ	d.f. ^b	$\Lambda \mid \Delta AIC$ ^c	p
♂	m0 _μ	μ ₀		42.6		
	m1 _μ	μ ₀ + G	σ ₀ + G + R	67.4	m1 _μ – m0 _μ : 589.3 539.7	1.6 · 10 ^{–108}
	m2 _μ	μ ₀ + G + R		106.8	m2 _μ – m1 _μ : 144.8 66.05	5.7 · 10 ^{–14}
♀	m0 _μ	μ ₀		28.9		
	m1 _μ	μ ₀ + G	σ ₀ + G + R	52.04	m1 _μ – m0 _μ : 454.5 408.2	1.2 · 10 ^{–81}
	m2 _μ	μ ₀ + G + R		102.4	m2 _μ – m1 _μ : 210.0 109.2	2.2 · 10 ^{–21}
♂	m0 _σ		σ ₀	49.8		
	m1 _σ	μ ₀ + G + R	σ ₀ + G	60.1	m1 _σ – m0 _σ : 131.6 111.0	3.3 · 10 ^{–23}
	m2 _σ		σ ₀ + G + R	106.8	m2 _σ – m1 _σ : 177.2 83.7	4.5 · 10 ^{–17}
♀	m0 _σ		σ ₀	50.5		
	m1 _σ	μ ₀ + G + R	σ ₀ + G	66	m1 _σ – m0 _σ : 68.6 37.6	1.2 · 10 ^{–8}
	m2 _σ		σ ₀ + G + R	102.4	m2 _σ – m1 _σ : 129.6 56.7	2.3 · 10 ^{–12}

^a GAMLSS models $\mu = \mu_0 + G \cdot \alpha_1 + R \cdot \omega_1$ и $\ln(\sigma) = \sigma_0 + G \cdot \alpha_2 + R \cdot \omega_2$, describing the effect of a particular genotype effect G and a random effect R of experimental replications (tube) on parameters of the Gumbel survival function; ^b degrees of freedom of the model; ^c Λ , logarithm of the likelihood ratio; and ΔAIC , difference between the values of the Akaike informative criterion for the models compared.

продолжительности жизни между линиями DGRP (таблица, см. рис. 2, а) $s_\mu = 6.5$ для самцов и $s_\mu = 4.6$ для самок, где s_μ – среднеквадратичное отклонение в ожидаемой продолжительности жизни для различных линий DGRP. При этом средняя продолжительность жизни для самок и самцов высоко коррелирована ($r = 0.86$, $p < 0.001$). Схожим образом варьирует и средняя продолжительность жизни для самок 197 линий DGRP, выращенных при 25 °C, $s_\mu = 9.9$ (Ivanov et al., 2015). Во многом подобные отличия в средней продолжительности жизни между линиями DGRP неудивительны, так как роль генотипа в определении продолжительности жизни хорошо известна (Van Raamsdonk, 2017).

Фенотипическая изменчивость продолжительности жизни обратно коррелирует с ожидаемой продолжительностью жизни. Параметр β в функции дожития Гумбеля $S(t) = \exp[-\exp(\frac{t-\tau}{\beta})]$ соответствует крутизне кривых дожития в абсолютной шкале времени, равно как и стандартное отклонение от ожидаемой продолжительности жизни (так как $\sigma = \frac{\pi \cdot \beta}{\sqrt{6}}$; см. рис. 1, а). Разброс по крутизне в кривых дожития между DGRP линиями существенно меньше, чем по средней продолжительности жизни (рис. 3, а). Так, для мух, выращенных при 29 °C, $s_\sigma = 2.1$ и 1.0 – для самцов и самок соответственно и для самок, выращенных при 25 °C, $s_\sigma = 4.6$ (Ivanov et al., 2015). Тем не менее влияние генотипа на данный параметр статистически значимо (см. таблицу). Однако изменения в крутизне кривых дожития не коррелируют с изменениями в средней продолжительности жизни как для мух, выращенных при 29 °C (см. рис. 3, б), так и для мух, выращенных при 25 °C (см. рис. 3, в). Иными словами, в абсолютной шкале времени параметры функции $S(t)$, μ – сдвиг и σ – крутизна, меняются независимо под влиянием генотипа.

Учитывая значимый разброс в средней продолжительности жизни между линиями DGRP, для адекватной оценки фенотипической изменчивости продолжительности

жизни мы использовали коэффициент вариации $C.V. = \sigma/\mu$. $C.V.$ отражает крутизну кривых дожития, масштабированных по средней продолжительности жизни $S(t/\mu)$ (см. рис. 1, б). Так же, как и σ , $C.V.$ варьирует в большей степени для самцов линий DGRP, выращенных при 29 °C, чем для самок (см. рис. 3, г). Однако, в отличие от σ , $C.V.$ обратно коррелирована со средней продолжительностью жизни как для мух, выращенных при 29 °C (см. рис. 3, д), так и для мух, выращенных при 25 °C (см. рис. 3, е). Таким образом, с увеличением ожидаемой продолжительности жизни падает фенотипическая изменчивость или, в реципрокных терминах, растет фенотипическая робастность самой же продолжительности жизни, рассматриваемая в данном контексте как фенотипический признак.

Влияние неучитываемых (стохастических) флуктуаций в среде на вариацию в продолжительности жизни. Следует отметить, что средняя продолжительность жизни для мух линий DGRP, выращенных при 29 °C в нашем эксперименте, никак не коррелирована с таковой для мух тех же линий, выращенных при 25 °C (Ivanov et al., 2015) (рис. 4, а). Помимо этого, учитывая то, что продолжительность жизни определялась в четырех-пяти биологических повторах (4–5 стаканчиков по 20 мух в каждой) для мух линий DGRP, выращенных при 29 °C, можно определить влияние неучитываемых (случайных) экспериментальных факторов на параметры кривых дожития. Действительно, влияние подобных неучитываемых флуктуаций статистически значимо как на среднюю продолжительность жизни (см. таблицу, рис. 4, б), так и на крутизну кривых дожития. Более того, крутизна кривых дожития в абсолютной шкале времени в сопоставимой степени зависит как от генетических, так и от случайных средовых факторов (см. таблицу, рис. 4, в).

Помимо этого, можно предположить, что фенотипически робастные генотипы с увеличенной продолжительностью жизни будут также обладать повышенной устойчивостью по отношению к спонтанным флуктуациям в среде. Действительно, коэффициенты вариации по средней про-

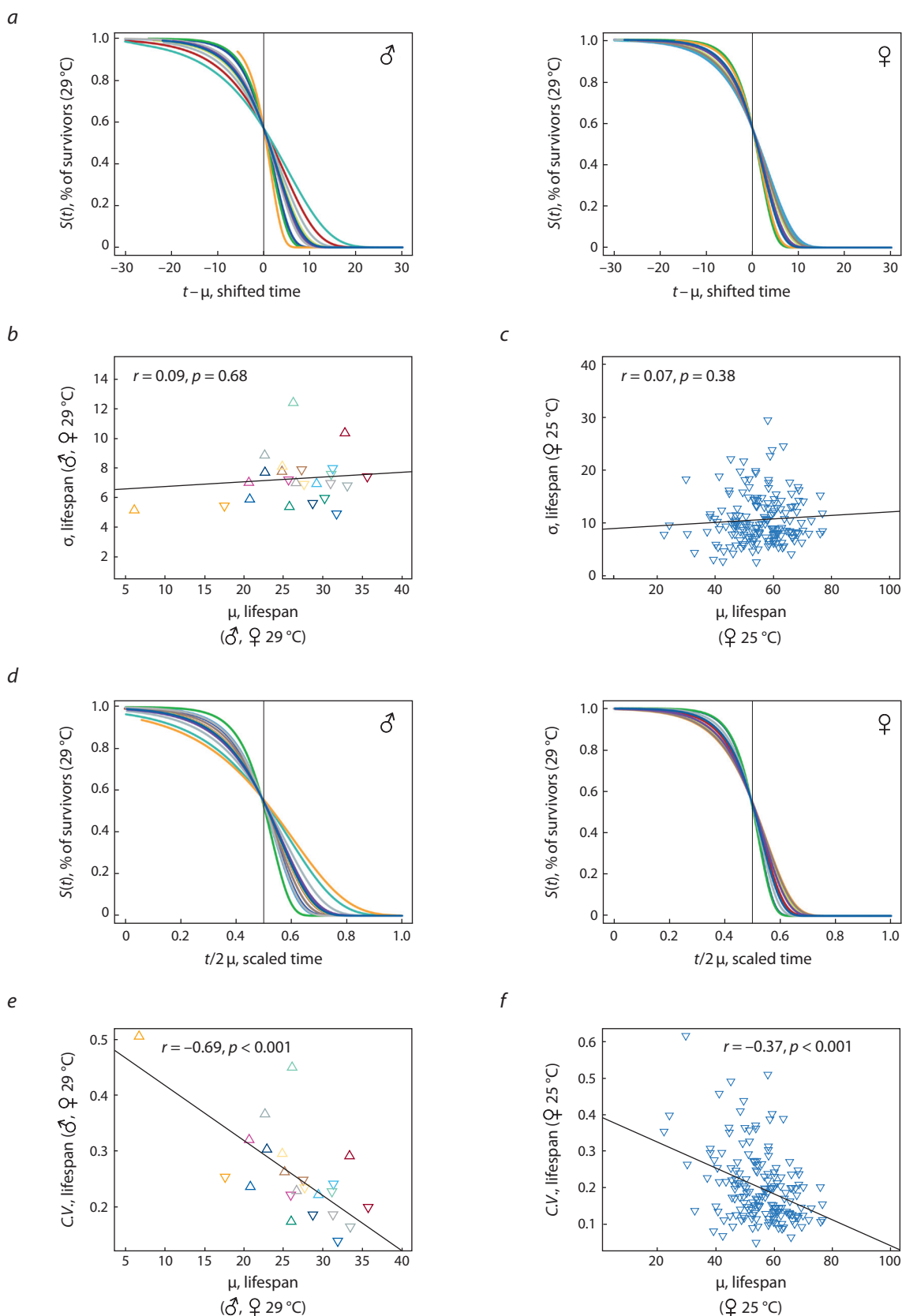


Fig. 3. Relationships among lifespan parameters μ , σ , and C.V.

(a) Survival curves (see Fig. 2a) centered around life expectancy ($t - \mu$). (b, c) Steepness of the survival curves σ in the absolute time scale does not correlate with life expectancy μ for inbred DGRP strains grown at (b) 29 °C and (c) 25 °C. The data for females grown at 25 °C are reported in (Ivanov et al., 2015). (d) Survival curves (Fig. 2a) in the mean-normalized ($t/2\mu$) time scale. (e, f) Coefficients of lifespan variation (C. V.) inversely correlate with life expectancy μ for flies grown at (e) 29 °C and (f) 25 °C.

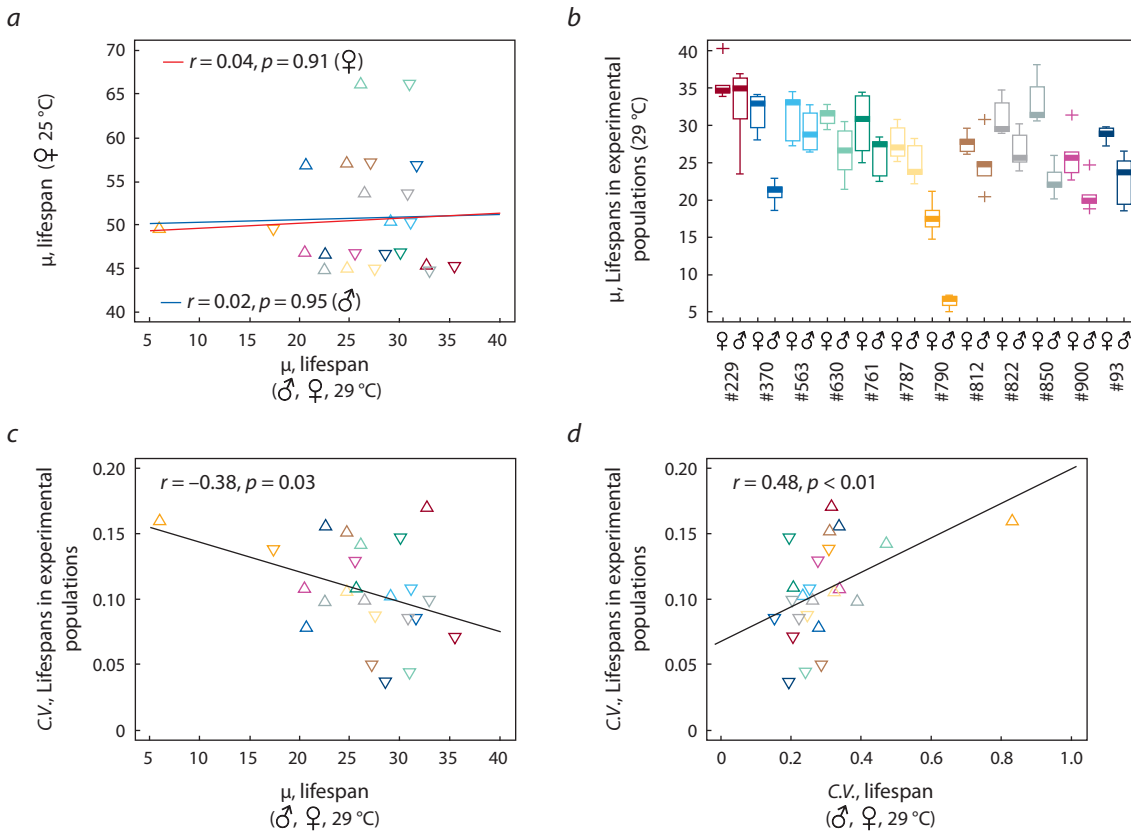


Fig. 4. Effects of experimental fluctuations on aging.

(a) Life expectancies for females and males of inbred DGRP strains grown at 29 °C closely correlate to each other ($r = 0.86$) but not to the mean lifetime of females of the same strains grown at 25 °C. (b) Life expectancies for inbred DGRP strains grown at 29 °C broadly vary among the experimental populations (individual tubes). (c, d) Coefficients of life expectancy variation estimated for each population of DGRP strains inversely correlate with mean lifespan (c) and directly with C. V. (d) determined from data integrated for each DGRP strain (Fig. 2).

должительности жизни между биологическими повторами обратно коррелируют со средней продолжительностью жизни (см. рис. 4, в) и положительно – с C.V. (см. рис. 4, г), определенными на основе общей выборки.

Временное масштабирование функции дожития $S(t)$ при разных температурах. Ранее было показано, что при изменении температуры (T_i, T_j) функции дожития масштабируются по времени как $S_{T_i}(t|\mu_i, \sigma_i) \approx S_{T_j}(\frac{\mu_j}{\mu_i} \cdot t|\mu_j, \sigma_j)$ для *Caenorhabditis elegans* (Stroustrup et al., 2016). Иными словами, при увеличении температуры кривые дожития смещаются и сжимаются пропорционально (для $T_i > T_j$, $\mu_i > \mu_j$ и $\sigma_i > \sigma_j$) при сохранении равенства в C.V. $\left\{\frac{\sigma_i}{\mu_i} = \frac{\sigma_j}{\mu_j}\right\}$, т.е. нормализованной крутизны (см. Материалы и методы; рис. 1, б). Это, в свою очередь, предполагает, что сдвиг в кинетике реакций за счет температуры ($\ln(k) \sim -1/T$) пропорционально ускоряет или замедляет старение.

Так как мухи – пойкилотермные животные, то можно ожидать схожее масштабирование функции дожития, как у нематод, при изменении температуры. Действительно, сопоставление параметров функций дожития для линий DGRP, выращенных при 29 °C и 25 °C, выявило, что $\mu_{25\text{ °C}} > \mu_{29\text{ °C}}$ и $\sigma_{25\text{ °C}} > \sigma_{29\text{ °C}}$, в то время как C.V._{25 °C} $\approx$

$\approx$ C.V._{29 °C} (рис. 5, а). Таким образом, кривые дожития, нормализованные на среднюю продолжительность жизни, оказываются приблизительно равными:

$$S_{25\text{ °C}}\left[\frac{1}{\mu_{25\text{ °C}}}|1, \sigma_{25\text{ °C}}\right] \approx S_{29\text{ °C}}\left[\frac{1}{\mu_{29\text{ °C}}}|1, \sigma_{29\text{ °C}}\right]$$

(см. рис. 5, б, в). Отсюда следует, что температура ожидаемо сдвигает среднюю продолжительность жизни, но, в отличие от генотипа, не влияет на фенотипическую изменчивость, выраженную через C.V.

Заключение

В настоящей работе мы обнаружили следующую закономерность: фенотипическая изменчивость в продолжительности жизни, выраженная через коэффициент вариации, обратно коррелирует со средней продолжительностью жизни для разных генотипов *Drosophila melanogaster*. В свою очередь, фенотипическая робастность как обратная величина к C.V. положительно коррелирует со средней продолжительностью жизни. По большому счету это проистекает из того, что средняя продолжительность жизни и среднеквадратичное отклонение в продолжительности жизни декоррелированы. И так как C.V. показывает фенотипическую изменчивость, нормированную на среднее значение, то это и приводит к обратному соотношению

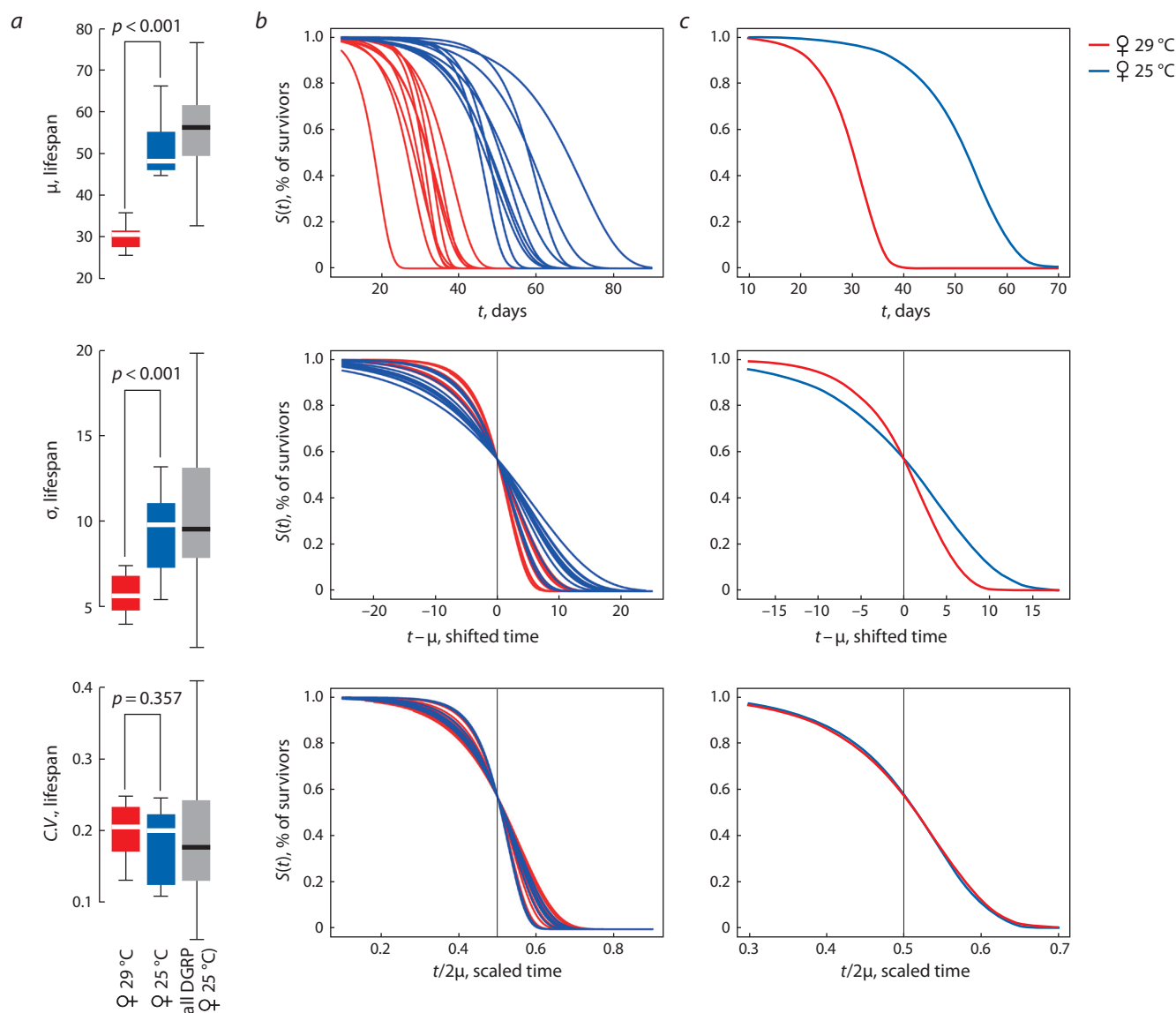


Fig. 5. Time scaling of survival curves with temperature.

(a) Boxplots of lifespan parameters: μ , σ , and C.V. for females of DGRP strains grown at 29 °C (red boxes), for females of the same strains grown at 25 °C (blue boxes), and for females of other DGRP strains grown at 25 °C (gray boxes) (Ivanov et al., 2015). The comparisons are based on paired Student's t test. Boxes correspond to the 1st and the 3rd interquartile ranges, lines indicate medians, and whiskers define the sample range without outliers. It is evident that the absolute steepness (σ) of the survival curves changes with temperature, whereas normalized steepness (C.V.) does not. (b) Gumbel survival curves calculated from estimated μ and σ parameters for DGRP strains grown at 29 °C (red lines) and 25 °C (blue lines). (c) Gumbel survival curves calculated from averaged μ and σ parameters for DGRP strains grown at 29 °C (red lines) and 25 °C (blue lines).

между изменчивостью в продолжительности жизни с самой продолжительностью жизни.

Отсюда возникает вопрос о том, что первично, а что вторично: увеличение продолжительности жизни приводит к увеличению фенотипической робастности либо, наоборот, фенотипическая робастность определяет увеличение продолжительности жизни? В нашем понимании причинно-следственных связей, мы склоняемся ко второй интерпретации. Действительно, 1) нам не известно ни одного гена, единственной функцией которого был бы контроль над продолжительностью жизни. Большинство известных генов, регулирующих продолжительность жизни, в первую очередь, участвуют в таких процессах,

как репарация ДНК (включая репликацию теломер), метаболизм и т. д., которые и определяют общую стабильность и устойчивость биологической системы (Kenyon et al., 1993; Ayyadevara et al., 2008; Garinis et al., 2008; Zane et al., 2014; Ivanov et al., 2015; Proshkina et al., 2015; Pan, Finkel, 2017; Van Raamsdonk, 2017); 2) нам не известно ни одного внешнего фактора, который бы напрямую регулировал исключительно продолжительность жизни. Так, например, диета влияет прежде всего на метаболизм и, следовательно, на продолжительность жизни.

Таким образом, мы полагаем, что стабильные биологические системы могут отличаться повышенной фенотипической робастностью и, как следствие, увеличенным

временем жизни. Это мы и наблюдаем при сопоставлении фенотипической изменчивости продолжительности жизни со средней продолжительностью жизни.

Acknowledgments

The purchase of laboratory animals was supported by State Budgeted Project 0324-2017-0004 (Bioresource Collections). A.V.P. acknowledges the support of data analysis and interpretation by the Russian Science Foundation, project 16-14-10288. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ayyadevara S., Alla R., Thaden J.J., Shmookler Reis R.J. Remarkable longevity and stress resistance of nematode PI3K-null mutants. *Ageing Cell*. 2008;7:13-22. DOI 10.1111/j.1474-9726.2007.00348.x.
- Garinis G.A., van der Horst G.T., Vijg J., Hoeijmakers J.H. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat. Cell Biol.* 2008;10:1241-1247. DOI 10.1038/ncb1108-1241.
- Gompertz B. On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1825;115:513-583. DOI 10.1098/rstl.1825.0026.
- Greenwood F.R.S. "Laws" of mortality from the biological point of view. *J. Hyg.* 1928;28:267-294. DOI 10.1017/S002217240000961X.
- Gumbel E.J. *Statistics of extremes*. N. Y.: Columbia University Press, 1958.
- Huang W., Massouras A., Inoue Y., Peiffer J., Ramia M., Tarone A.M., Turlapati L., Zichner T., Zhu D., Lyman R.F., Magwire M.M., Blankenburg K., Carbone M.A., Chang K., Ellis L.L., Fernandez S., Han Y., Highnam G., Hjelmén C.E., Jack J.R., Javai M., Jayaseelan J., Kalra D., Lee S., Lewis L., Munidasa M., Ongeri F., Patel S., Perales L., Perez A., Pu L., Rollmann S.M., Ruth R., Saada N., Warner C., Williams A., Wu Y.Q., Yamamoto A., Zhang Y., Zhu Y., Anholt R.R., Korbel J.O., Mittelman D., Muzny D.M., Gibbs R.A., Barbadilla A., Johnston J.S., Stone E.A., Richards S., Deplancke B., Mackay T.F. Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* genetic reference panel lines. *Genome Res.* 2014;24:1193-1208. DOI 10.1101/gr.171546.113.
- Hulbert A.J., Pamplona R., Buffenstein R., Buttemer W.A. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* 2007;87:1175-1213. DOI 10.1152/physrev.00047.2006.
- Ivanov D.K., Escott-Price V., Ziehm M., Magwire M.M., Mackay T.F., Partridge L., Thornton J.M. Longevity GWAS using the *Drosophila* Genetic Reference Panel. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2015;70:1470-1478. DOI 10.1093/gerona/glv047.
- Kapahi P., Kaeberlein M., Hansen M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Res. Rev.* 2017;39:3-14. DOI 10.1016/j.arr.2016.12.005.
- Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958;53:457-481. DOI 10.2307/2281868.
- Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993;366:461-464. DOI 10.1038/366461a0.
- Lopez-Otin C., Galluzzi L., Freije J.M., Madeo F., Kroemer G. Metabolic control of longevity. *Cell*. 2016;166:802-821. DOI 10.1016/j.cell.2016.07.031.
- Mackay T.F., Richards S., Stone E.A., Barbadilla A., Ayroles J.F., Zhu D., Casillas S., Han Y., Magwire M.M., Cridland J.M., Richardson M.F., Anholt R.R., Barron M., Bess C., Blankenburg K.P., Carbone M.A., Castellano D., Chaboub L., Duncan L., Harris Z., Javai M., Jayaseelan J.C., Jhangiani S.N., Jordan K.W., Lara F., Lawrence F., Lee S.L., Librado P., Linheiro R.S., Lyman R.F., Mackey A.J., Munidasa M., Muzny D.M., Nazareth L., Newsham I., Perales L., Pu L.L., Qu C., Ramia M., Reid J.G., Rollmann S.M., Rozas J., Saada N., Turlapati L., Worley K.C., Wu Y.Q., Yamamoto A., Zhu Y., Bergman C.M., Thornton K.R., Mittelman D., Gibbs R.A. The *Drosophila melanogaster* genetic reference panel. *Nature*. 2012;482:173-178. DOI 10.1038/nature10811.
- Mair W., Goymer P., Pletcher S.D., Partridge L. Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science*. 2003;301:1731-1733. DOI 10.1126/science.1086016.
- Markov A.V., Naimark E.B., Yakovleva E.U. Temporal scaling of age-dependent mortality: dynamics of aging in *Caenorhabditis elegans* is easy to speed up or slow down, but its overall trajectory is stable. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81:906-911. DOI 10.1134/S0006297916080125.
- Missov T.I., Lenart A., Nemeth L., Canudas-Romo V., Vaupel J.W. The Gompertz force of mortality in terms of the modal age at death. *Demographic Res.* 2015;32:1031-1048. DOI 10.4054/DemRes.2015.32.36.
- Moore D.F. *Applied Survival Analysis Using R*. Springer International Publishing, 2016.
- Pan H., Finkel T. Key proteins and pathways that regulate lifespan. *J. Biol. Chem.* 2017;292:6452-6460. DOI 10.1074/jbc.R116.771915.
- Proshkina E.N., Shaposhnikov M.V., Sadritdinova A.F., Kudryavtseva A.V., Moskalev A.A. Basic mechanisms of longevity: A case study of *Drosophila* pro-longevity genes. *Ageing Res. Rev.* 2015;24:218-231. DOI 10.1016/j.arr.2015.08.005.
- Rigby R.A., Stasinopoulos D.M. Generalized additive models for location, scale and shape. *J. Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*. 2005;54:507-554. DOI 10.1111/j.1467-9876.2005.00510.x.
- Rogina B. INDY-A New link to metabolic regulation in animals and humans. *Front. Genet.* 2017;8:66. DOI 10.3389/fgene.2017.00066.
- Shaw R.F., Bercaw B.L. Temperature and life-span in poikilothermous animals. *Nature*. 1962;196:454-457. DOI 10.1038/196454a0.
- Speakman J.R. Body size, energy metabolism and lifespan. *J. Exp. Biol.* 2005;208:1717-1730. DOI 10.1242/jeb.01556.
- Stasinopoulos D.M., Rigby R.A. Generalized additive models for location scale and shape (GAMLSS). *J. Stat. Softw.* 2007;23:46. DOI 10.18637/jss.v023.i07.
- Stroustrup N., Anthony W.E., Nash Z.M., Gowda V., Gomez A., Lopez-Moyado I.F., Apfeld J., Fontana W. The temporal scaling of *Caenorhabditis elegans* ageing. *Nature*. 2016;530:103-107. DOI 10.1038/nature16550.
- Tacutu R., Craig T., Budovsky A., Wuttke D., Lehmann G., Taranukha D., Costa J., Fraifeld V.E., de Magalhães J.P. Human ageing genomic resources: integrated databases and tools for the biology and genetics of ageing. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D1027-D1033. DOI 10.1093/nar/gks1155.
- Therneau T.M., Grambsch P.M. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. N. Y.: Springer-Verlag, 2000.
- Van Raamsdonk J.M. Mechanisms underlying longevity: A genetic switch model of aging. *Exp. Gerontol.* 2017. Ahead of print. DOI 10.1016/j.exger.2017.08.005.
- Vermeij W.P., Dolle M.E., Reiling E., Jaarsma D., Payan-Gomez C., Bombardieri C.R., Wu H., Roks A.J., Botter S.M., van der Eerden B.C., Youssef S.A., Kuiper R.V., Nagarajah B., van Oostrom C.T., Brandt R.M., Barnhoorn S., Imholz S., Pennings J.L., de Bruin A., Gyenis A., Pothof J., Vijg J., van Steeg H., Hoeijmakers J.H. Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice. *Nature*. 2016;537:427-431. DOI 10.1038/nature19329.
- Zane L., Sharma V., Misteli T. Common features of chromatin in aging and cancer: cause or coincidence? *Trends Cell Biol.* 2014;24:686-694. DOI 10.1016/j.tcb.2014.07.001.



Нейроэндокринная стресс-реакция насекомых: история развития концепции

М.А. Еремина , Н.Е. Грунтенко

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

Нейроэндокринная стресс-реакция является эффективным способом защиты организмов от неблагоприятных воздействий различной природы. Эта реакция универсальна и возникает в ответ на стимулы, непривычные для жизни и обитания не только данного вида организмов, но и отдельной популяции. В обзоре рассматривается последовательная смена теоретических концепций, подходов и методов исследования в этой научной области: от становления концепции стресса Г. Селье до наших дней. В 1982 г. Г. Селье определил стресс как совокупность стереотипных филогенетических запрограммированных реакций организма, которые вызываются любыми сильными, сверхсильными, экстремальными воздействиями и сопровождаются перестройкой адаптивных сил организма. Агент, вызывающий стресс, был назван стрессором. В динамике комплекса неспецифических защитно-приспособительных реакций в ответ на стрессовое воздействие, направленных на создание устойчивости (резистентности) организма к любому фактору, закономерно прослеживаются три стадии («триада Селье»): 1) реакция тревоги, 2) стадия резистентности, 3) стадия истощения. Длительность и выраженность каждой из них могут варьировать в зависимости от природы и силы стрессорного агента, вида животного и физиологического состояния организма. Отсутствие гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы у насекомых считалось доказательством невозможности развития у них стресс-реакции по типу теплокровных животных. Тем не менее с начала 1980-х годов получено достаточно доказательств развития реакции стресса у насекомых, что подчеркивает консервативность стресс-реакции у млекопитающих и насекомых. Сходство в нейрохимических и физиологических изменениях у беспозвоночных и позвоночных в ответ на стрессорное воздействие свидетельствует о том, что реакция на стрессор – это совокупность древних, сохранных в эволюции механизмов. Насекомые предоставляют уникальные возможности для экспериментов, которые могут помочь понять основные механизмы стрессовых реакций. У личинок насекомых механизм стресс-реакции изучен детально. В этом веке основные усилия исследователей направлены на изучение механизмов стресс-реакции у имаго насекомых и генетического контроля отдельных ее звеньев. Изучение стресс-реакции у насекомых важно и в теоретическом плане – оно демонстрирует конвергентность путей эволюции адаптивных преобразований у таких далеко отстоящих друг от друга таксонов, как насекомые и млекопитающие, и в практическом – закономерности механизма этой реакции можно использовать при моделировании наследственных или приобретенных заболеваний человека, разработке методов разведения хозяйственно ценных насекомых и способов борьбы с насекомыми-вредителями.

Ключевые слова: нейроэндокринная стресс-реакция; гормоны насекомых; приспособленность.

The neuroendocrine stress-response in insects: the history of the development of the concept

M.A. Eremina , N.E. Gruntenko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The neuroendocrine stress-response is an effective defense mechanism against adverse influences of various nature. This reaction is universal and appears in response to stimuli that are unusual not just for living and habitat of the species, but also for each population. Here we review a progressive change of theoretical concepts, approaches and methods of research in this scientific field: beginning with the development of the stress concept by H. Selye and up to the present day. In 1982 H. Selye defined stress as a combination of stereotypical phylogenetic programmed reactions of the organism that are caused by any strong, super-strong or extreme influences and are followed by a reorganization of the organism's adaptive forces. The stress-causing agent was named a stressor. In the dynamics of the complex of nonspecific protective-adaptive reactions that respond to a stressful influence aimed at cultivating the organism's resistance to any factor, it is possible to logically identify three stages ("the Selye triad"): 1) alarm state, 2) resistance state, 3) exhaustion state. The duration and the expression of each stage can vary depending on the nature and strength of the stressor agent, the species of the animal and the physiological state of the organism. The lack of a hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in insects was considered a proof of their inability to develop a stress reaction of the warm-blooded animals' type. Nevertheless, since the early 1980s, enough evidence of the development of stress reaction in insects has been gathered, which emphasizes the conservative nature of the stress reaction in mammals and insects. The similarity in the neurochemical and physiological changes in invertebrates and vertebrates in response to a stressful influence indicates that the response to a stressor is a complex of ancient mechanisms preserved in evolution. Insects present unique opportunities for experimentation, which can allow us to understand the basic mechanisms of stress reactions. In insect larvae the mechanism of stress reaction has been studied in detail. In this century, the main efforts of researchers are aimed at studying the mechanisms of stress reaction in imago and genetic control of its individual links. The study of stress reaction in insects has both theoretical importance, as it demonstrates the convergence of evolutionary pathways



of adaptive transformations in such distant taxa as insects and mammals, and practical importance, since the patterns of this reaction's mechanisms can be used in modeling hereditary or acquired human diseases, in developing breeding methods for economically valuable insects and in finding ways to fight insect pests.

Key words: neuroendocrine stress-response; insect hormones; fitness.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Еремина М.А., Груntenко Н.Е. Нейроэндокринная стресс-реакция насекомых: история развития концепции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):825-832. DOI 10.18699/VJ17.302

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Eremina M.A., Gruntenko N.E. The neuroendocrine stress-response in insects: the history of the development of the concept. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):825-832. DOI 10.18699/VJ17.302 (in Russian)

Термин «стресс» переводится с английского языка как «напряжение». Физиологические аспекты стресса впервые были освещены У. Кенноном (Cannon, 1932) в классических работах по универсальной реакции «бороться или бежать». Кроме того, он ввел в физиологию понятие «гомеостаз», считая, что постоянство внутренней среды организма поддерживается благодаря симпатической нервной системе и гормонам. Чем сложнее организм, тем тоньше, многочисленнее и разнообразнее система противовесов в нем. Она обеспечивается формированием как постоянных, так и временных связей, устанавливающих соотношения между мельчайшими элементами внешнего мира и тончайшими реакциями организма (Cannon, 1932).

Множество операций, проведенных в школе У. Кеннона над животными, доказало, что внешне наблюдаемые изменения в поведении, которые можно назвать эмоциональными, порождаются глубинными сдвигами в нейрогуморальных процессах. Эти сдвиги готовят организм к критическим ситуациям, требующим повышенной траты энергии, снятия усталости, предотвращения кровопотери и т. п. В одном из докладов о своих открытиях Кеннон сообщил, что благодаря выбрасываемому в кровь при сильных эмоциях адреналину в числе других его «мобилизационных» эффектов происходит увеличение в крови уровня сахара, поступающего к мышцам (Cannon, 1932).

А.А. Виру (1981) указывает на то, что в отдельных работах отечественных ученых (А.Д. Сперанского, Д.Н. Насонова, М.Я. Александрова, А. Цанка) четко прослеживаются верные направления в раскрытии механизмов неспецифической адаптации. Так, еще в 1934 г. Д.Н. Насонов в своих исследованиях показал, что содержимое живой клетки (протоплазма) поразительно однотипно реагирует на любые изменения окружающей среды. Этот стереотип ответов клетки был назван Насоновым «паранекрозом». Так фактически был открыт стресс, но не на организменном, а на клеточном уровне (Апчел, Цыган, 1999).

Классическое учение о стрессе и адапционном синдроме создано Г. Селье (1979). Он писал, что впервые «наткнулся» на идею стресса и общего адаптационного синдрома в 1925 г. 4 июля 1936 г. в журнале «Nature» было опубликовано его письмо в редакцию «Синдром, вызываемый различными повреждающими агентами», в котором приводились данные о стандартных реакциях организма на действие различных болезнетворных агентов (Апчел,

Цыган, 1999). Это сообщение положило начало учению о стрессе, хотя в отдельных, более ранних, научных трудах В. Вундта (1980) и В. Джемса (1905) было упоминание о проблеме стресса с психологической точки зрения.

Г. Селье длительное время избегал употребления термина «стресс», поскольку тот широко использовался для обозначения нервно-психического напряжения. Только в 1946 г. Селье начал систематически использовать термин «стресс» для общего адаптационного напряжения. Он сформулировал концепцию стресса, при этом рассматривал физиологический стресс как ответ на любые предъявленные к организму требования и считал, что с какой бы трудностью не столкнулся организм, с ней можно справиться двумя типами реакций: активной, или борьбы, и пассивной, в виде бегства от трудностей или готовности терпеть их. Полная свобода от стресса, как считал Г. Селье, означала бы смерть (Китаев-Смык, 1983). В 1982 г. Селье определил стресс как совокупность стереотипных филогенетических запрограммированных реакций организма, которые вызываются любыми сильными, сверхсильными, экстремальными воздействиями и сопровождаются перестройкой адаптивных сил организма (Селье, 1987).

В общебиологическом плане, по мнению Ф.З. Меерсона (1981), стресс-реакция сформировалась в процессе эволюции как необходимое неспецифическое звено более сложного целостного механизма адаптации.

Стрессор – всякое достаточное сильное (не обязательно экстремальное) воздействие: тепло, холод, эмоциональное воздействие, болевые раздражения, голодание, интоксикация и т. д. В динамике комплекса неспецифических защитно-приспособительных реакций в ответ на стрессовое воздействие, направленных на создание устойчивости (резистентности) организма к любому фактору, закономерно прослеживаются три стадии («триада Селье»): 1) реакция тревоги, 2) стадия резистентности, 3) стадия истощения. Длительность и выраженность каждой стадии могут варьировать в зависимости от природы и силы стрессорного агента, вида животного и физиологического состояния организма (Селье, 1979).

Первая стадия синдрома (реакция тревоги) характеризует остро протекающую, активную мобилизацию адаптационных процессов в организме в ответ на всякое смещение гомеостаза при стрессе (на первичный шок). В это время устойчивость организма к воздействиям быстро возрас-

тает. Во второй стадии (резистентности) устанавливается повышенная сопротивляемость к стрессору, которая носит общий, неспецифический характер. Например, если стресс вызывается холодом, то на стадии резистентности выявляется повышенная устойчивость не только к холоду, но и к действию повышенной температуры, рентгеновских лучей, токсинов и т. д. В случаях, когда стресс слишком сильный или длительный, защитно-приспособительные механизмы организма могут истощаться и общий адаптационный синдром переходит в третью стадию (стадия истощения), характеризующуюся снижением резистентности организма к данному стрессору и другим видам стрессорных воздействий. Эта стадия называется также вторичным шоком (Селье, 1979).

По признанию Г. Селье, он заимствовал очень многое у И.П. Павлова. То, что Павлов трактовал с точки зрения нервной системы, он перевел на язык и термины гуморальной системы. Г. Селье не считал стресс вредным, а рассматривал его как реакцию, помогающую организму выжить. Он назвал отрицательный стресс дистрессом, а положительный стресс – эустрессом (Селье, 1979). В своем учении о стрессе и адаптационном синдроме Селье основное внимание обращал на роль гормональных изменений, не анализируя участие нервной системы в механизме формирования стресса. Последнее подверглось критике в отечественной литературе. Причем неоднократно подчеркивалось, что стресс-реакция развивается как цепь событий, опосредованных гипоталамо-гипофизарно-адреноректорной системой (Косицкий, Смирнов, 1970; Горизонтов, 1973; Погодаев, 1976).

Нейроэндокринная стресс-реакция насекомых

Отсутствие гипоталамо-гипофизарно-адреноректорной системы у насекомых считалось доказательством невозможности развития у них стресс-реакции по типу теплокровных животных (Косицкий, Смирнов, 1970). Тем не менее с начала 1980-х годов получено достаточно доказательств развития реакции стресса у насекомых (Rauschenbach et al., 1980, 1983a, b, 1987, 2014; Cymborowski et al., 1982; Chernysh, 1991; Harris, Woodring, 1992; Mobius, Penzlin, 1993; Hirashima et al., 2000; Pszczolkowski, Chiang, 2000; Gruntenko et al., 2004, 2010; Neckameyer, Weinstein, 2005; Tauchman et al., 2007; Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Эволюцией создано две «стратегии выживания» насекомых в неблагоприятных условиях внешней среды: состояние диапаузы и состояние задержки метаморфоза у недиапаузирующих насекомых. И тот и другой тип приспособления позволяют насекомым пережить неблагоприятные условия. Гормональную основу обоих типов составляет нейроэндокринная стресс-реакция, обладающая двумя основными чертами – неспецифичностью по отношению к воздействию (возникает при действии экстремальных факторов различной природы) и адаптивностью. Но именно такие характеристики свойственны реакции, обозначенной термином «стресс» у млекопитающих (Rauschenbach et al., 1987).

В стресс-реакцию насекомых вовлечены различные гормоны, в частности биогенные амины (дофамин (ДА), октопамин (ОА), серотонин), экдистероиды, ювенильный

гормон (ЮГ), адипокинетический гормон (АКГ) (Kodrík et al., 2015) и инсулин (Грунтенко, 2008; Johnson, White, 2009; Gruntenko, Rauschenbach, 2017).

Эндокринные органы синтезируют, накапливают и выделяют в гемолимфу гормоны, регулирующие разнообразные физиологические процессы. Основные эндокринные органы насекомых охватывают нейросекреторные клетки (НСК) (место синтеза биогенных аминов), ретроцеребральный комплекс, состоящий из двух пар желез, называемых кардиальными (*corpora cardiaca*) (место синтеза АКГ) и прилежащими телами (*corpora allata*, CA) (место синтеза ЮГ), перисимпатические органы и проторакальные железы (место синтеза 20-гидроксиэкдизона (20Э)) (Тыщенко, 1986).

Биогенные амины у насекомых выполняют функции нейромедиаторов, нейромодуляторов, оказывающих локальное влияние на близлежащие клетки в центральной нервной системе, способствующее изменению эффекта нейромедиаторов и нейрогормонов, переносимых током гемолимфы и действующих на больших расстояниях (Evans, 1985; Janković-Hladni, 1991; Johnson, White, 2009).

В ходе личиночного развития насекомого ЮГ определяет характер линьки, инициированной 20Э, и препятствует преждевременному метаморфозу: при высоком титре ЮГ происходит личиночная линька, при его резком падении – метаморфоз. У имаго ЮГ и 20Э играют роль гонадотропинов: определяют половое поведение самок, контролируют развитие яичников и вителлогенез, стимулируют синтез феромонов, а также участвуют в регуляции личиночной и имагинальной диапаузы (Грунтенко, 2008).

АКГ стимулирует распад резервных триглицеридов в жировом теле, освобождая диглицеридную транспортную форму жиров, поступающих из трофоцитов в гемолимфу (Тыщенко, 1986).

Еще одним организатором стрессовых реакций как у позвоночных, так и у насекомых является сигнал инсулинового пути (Holzenberger et al., 2003; Jonson, White, 2009).

Проведены многочисленные исследования по изучению влияния высоких температур, низкого качества корма, инсектицидов и других стрессоров на НСК мозга и подглоточного ганглия (Ivanović et al., 1975, 1979, 1985, 1989; Janković-Hladni et al., 1983; Leković et al., 2001; Perić-Mataruga et al., 2001). Различные стрессорные воздействия разной интенсивности вызывают определенные изменения, что, в свою очередь, влияет на синтез и секрецию нейросекреторного материала (Janković-Hladni et al., 1992). В ряде работ показано, что ответ на уровне НСК у разных видов насекомых зависит от интенсивности стресс-фактора и продолжительности воздействия (Ivanović et al., 1975; Mrdaković et al., 2003).

Сигнал стрессора, полученный экстерорецепторами насекомого, передается через сенсорные нервные пути к мозгу. Первая стадия стресс-реакции в большой степени регулируется нейрогормонами и биогенными аминами (Davenport, Evans, 1984; Грунтенко, 2008). Под их влиянием в течение нескольких минут в жировом теле мобилизуются запасные вещества. На определенной стадии развития стресс-реакции к этой группе нейрогормонов присоединяются экдистероиды. Вторая стадия развития стресс-реакции проходит в полной зависимости от экди-

стероидов, синтез которых, в свою очередь, регулируется экдизиотропными нейрогормонами (экдизиотропинами) и ювенильным гормоном (Груntenko, 2008).

Таким образом, как у млекопитающих, так и у насекомых в неблагоприятных условиях внешней среды развивается неспецифическая стандартная гормональная реакция, имеющая адаптивный характер. У первых это реакция напряжения, увеличивающая энергетические возможности организма для обеспечения адаптации, у вторых – реакция угнетения гормональной системы, приводящая к торможению развития, что также обеспечивает адаптацию к неблагоприятным воздействиям. Следовательно, существо реакции, ее биологическое значение одинаково в обоих случаях (Rauschenbach et al., 1987; Раушенбах, 1990).

Исследования М. Vигас (1983) и К.В. Судак (1983) на млекопитающих свидетельствуют о том, что неспецифическая по механизму реакция стресса обладает определенной специфичностью по степени ее выраженности: а) стрессогенность воздействия зависит от его силы (существует порог); б) степень реакции зависит от вида животного (один и тот же стрессор может вызывать стресс у одних организмов и быть подпороговым у других). Сходство между рассматриваемой нейроэндокринной реакцией насекомых и стрессом млекопитающих существует и в этом плане: а) наличие порога при воздействии одного типа показано для *Rhodnius prolixus* (развитие личинок при 32 °С не сказывается на превращении в имаго, а при 35 °С имагинальная линька задерживается (Wigglesworth, 1952) и для *Drosophila virilis* (плотность в 40 личинок не влияет на метаморфоз, а плотность в 80 личинок задерживает его наступление (Раушенбах и др., 1983); б) зависимость от вида насекомого следует из данных о том, что у *D. virilis* температура 32 °С вызывает развитие стрессорной реакции (Rauschenbach et al., 1987), а для *R. prolixus* она является подпороговой (Wigglesworth, 1952, 1955).

Более того, продемонстрировано, что один и тот же фактор может быть, а может и не быть стрессорным для вида, в зависимости от того, на какой стадии развития он действует. Так, например, не всегда высокая плотность неблагоприятна для развития насекомых. Исходя из биологии вида, стрессорной может оказаться и низкая плотность популяции. Это положение хорошо иллюстрируется работой (Singh, Pandey, 1980). Сравнивая развитие личинок первого и третьего возраста *Diacrisia oblique* в условиях низкой и высокой плотности, авторы обнаружили, что самый длительный срок развития и самая высокая смертность характерны для культур личинок первого возраста с низкой плотностью и третьего возраста – с высокой. Таким образом, для первых стрессорными являются условия развития с низкой плотностью, тогда как для последних – с высокой. Другим примером могут служить исследования (Ivanovic et al., 1985), продемонстрировавшие, что температура 8 °С, стрессорная для личинок *Morimus funereus*, собранных в июне (вызывает ингибирование НСК, секретирующих проторакотропный гормон, ПТТГ), не вызывает стресса у личинок, собранных в ноябре. В то же время температура 23 °С является стрессорной для личинок, собранных в ноябре, и не приводит к стрессу июньских личинок.

Когда стрессорное воздействие существенно выше порогового, оно может вызвать у насекомых обратную реакцию – ускорение метаморфоза. Так, в работе С.И. Черныша (1983) продемонстрировано, что погружение личинок *Calliphora erythrocephala* в 40 % раствор формальдегида на 180 мин ускоряло формирование пупариума, тогда как погружение их на 90 мин вызывало замедление развития. Ускоренный метаморфоз отмечали при электрошоке личинок *Bombyx mori* (Черныш, 1983). Преждевременный метаморфоз наблюдается при повреждении кутикулы личинок при откладке яиц паразитирующей самкой (Lawrence, 1988). Следовательно, этот эффект имеет место только в случае многократного прокалывания кутикулы, при однократном прокалывании он отсутствует. Вместе с тем при умеренном повреждении кутикулы (пороговом) наблюдается стандартная стрессорная реакция – задержка метаморфоза, ингибирование секреции ПТТГ, задержка секреции экдизона, увеличение содержания ЮГ и снижение ЮГ-эстеразной активности (О'Каша, 1968; McCaleb, Kumaran, 1980; Bogus et al., 1986; Rauschenbach et al., 1987). Важно подчеркнуть, что структура стрессорной реакции несколько различается у насекомых со строго фиксированным числом личиночных возрастов и подвергающихся сверхчисленным линькам (Раушенбах, 1990).

Гормональный статус насекомых со сверхчисленными линьками в неблагоприятных условиях среды последовательно изучали Б. Цимборовский и М.И. Богус (Cymborowski, Bogus, 1976; Bogus, Cymborowski, 1981). Б. Цимборовский предложил схему стрессорной реакции, возникающей у личинок *Galleria mellonella* в условиях холодового стресса (Cymborowski, 1988). Автор предположил, что информация о температурном статусе тела личинок *G. mellonella* передается в мозг через вентральную нервную хорду, вызывая задержку в переключении с личиночной на куколичную программу. Позже исследователями была обнаружена целая группа регуляторных белков, выделяемых из нервной ткани и контролирующих синтез ЮГ посредством СА, – аллатотропины и аллатостатины, стимулирующие и ингибирующие модуляторы, которые достигают СА либо посредством прямой нейро-секреторной иннервации, либо через гемолимфу (Tobe, Stay, 1985; Cymborowski, 1988; Richard et al., 1990; Kramer et al., 1991; Stay et al., 1996; Bendena et al., 1999).

Таким образом, показано, что изменения в содержании гормонов при развитии насекомых в неблагоприятных условиях взаимосвязаны и что в этих условиях у них возникает неспецифическая гормональная реакция, подобная стрессу млекопитающих (Rauschenbach et al., 1987; Cymborowski, 1988).

Современное состояние исследований нейроэндокринной стресс-реакции насекомых

Насекомые представляют уникальные возможности для экспериментов, которые могут помочь определить основные механизмы стрессовых реакций. Кроме того, прикладные аспекты контроля численности как вредных, так и полезных насекомых требуют более глубокого понимания механизмов действия стрессоров на организм (Johnson, White, 2009).

У личинок насекомых механизм стресс-реакции изучен детально. Показано, что именно повышение содержания ЮГ при стрессе вызывает состояние диапаузы или задержку метаморфоза у недиапаузирующих насекомых, позволяя им таким образом переждать неблагоприятные условия (Rauschenbach et al., 1987; Cymborowski, 1988). Кроме того, у личинок насекомых наблюдается повышение содержания биогенных аминов (Hirashima, Eto, 1993; Hirashima et al., 1994).

У имаго насекомых стресс-реакция направлена на попытку избежать вредного воздействия или же адаптироваться к неблагоприятным условиям, если первое невозможно (Раушенбах, 1997). В настоящее время основные усилия исследователей направлены на изучение механизмов стресс-реакции у имаго насекомых и генетического контроля отдельных ее звеньев (Ченцова и др., 2007; Грунтенко, 2008).

В работах И.Ю. Раушенбах с коллегами (Rauschenbach et al., 1987, 2014; Раушенбах, 1990, 1997; Раушенбах и др., 2000) и Н.Е. Грунтенко с коллегами (Gruntenko et al., 2000, 2003a, b, 2004, 2005a, b, 2010, 2012) исследован механизм стресс-реакции в процессе онтогенеза у *D. virilis* и *D. melanogaster*, определены основные маркерные характеристики стресс-реакции у личинки и имаго дрозофилы. Выяснено, что ни один из стресс-связанных гормонов дрозофилы не является пусковым звеном в развитии стресс-реакции. Для *D. virilis* показан моногенный контроль ответа на стресс всех гормональных систем (Раушенбах, 1997). У *D. melanogaster* выявлен комплекс генов, мутации в которых приводят к изменению интенсивности ответа на стрессор всех стресс-связанных гормонов (ДА, ОА, ЮГ и 20Э) и ферментов их метаболизма (Грунтенко, 2008).

В ряде работ (Беньковская и др., 2000, 2004, 2005, 2008; Гайфуллина и др., 2004; Салтыкова и др., 2005; Соколянская и др., 2005; Беньковская, Соколянская, 2008) обобщены результаты многолетних исследований, посвященных выяснению роли стресс-реакции в формировании онтогенетических адаптаций на примерах комнатной мухи *Musca domestica*, колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* и медоносной пчелы *Apis mellifera*. Показаны универсальный фазовый характер стресс-реакции насекомых и сложная структура стадии реакции тревоги, согласующаяся с фундаментальной схемой Г. Селье (1979) и подтверждающая общность защитной реакции в отдаленных таксонах животного мира. Установлены роль стресса и место стресс-реакции в микроэволюционных преобразованиях популяций насекомых как механизма реализации адаптивного потенциала особи и популяции. Одновременно продемонстрирована роль стресс-реакции как преадаптивного стимула, повышающего адаптационные возможности особи и расширяющего границы адаптивного потенциала популяций насекомых.

Модель Н. Ивен с коллегами описывает общую реакцию стресса у медоносных пчел (Even et al., 2012). Эта работа обеспечивает основу для понимания того, как *A. mellifera* может реагировать на стрессоры, а также направлена на стимулирование исследований в данной области. Сравнение путей реагирования на стресс у позвоночных и медоносных пчел демонстрирует гомологичную структуру

реакции в этих двух группах животных, включая регуляцию возбуждения и стимуляции когнитивных функций в головном мозге при помощи катехоламинов в сочетании с нейрогормональными сигналами, стимулирующими мобилизацию энергии на периферии. Тем не менее степень, до которой пути стрессоустойчивости эволюционно сохраняются, остается неясной. Исследователи также выделили аспекты стрессовой реакции, которые, по-видимому, специфичны для медоносных пчел в результате их особой социальной организации.

В работе Е.А. Чертковой (2015) впервые показано повышение уровня ДА у капустной совки *Mamestra brassicae* и вошинной огневки *G. mellonella* при воздействии стресс-факторов абиотической природы (температура, механические повреждения). Также выявлено, что к увеличению уровня ДА приводит заражение личинок *G. mellonella* бактериями *Bacillus thuringiensis*, а колорадского жука *L. decemlineata* и *M. brassicae* – энтомопатогенными грибами *Metarhizium robertsii* и *Beauveria bassiana*. Кроме того, обнаружено, что степень повышения уровня ДА зависит от вирулентных свойств энтомопатогенного микроорганизма. Уровень ДА в гемолимфе личинок *L. decemlineata* повышается также при инфицировании энтомопатогенными бактериями *Bacillus thuringiensis*, и это повышение носит дозозависимый характер. По мнению автора, результаты этих исследований могут быть использованы для дальнейшего изучения стресс-реакции насекомых, лежащей в основе их резистентности к химическим и микробиологическим инсектицидам, и разработок методических подходов к ее преодолению (Черткова, 2015).

Множество работ посвящено изучению реакции окислительного стресса, ее механизму и способам защиты организма от него (Ahmad, 1995; Bi, Felton, 1995; Meng et al., 2009; Lalouette et al., 2011; Velki et al., 2011; Zhao, Haddad, 2011; Krishnan, Kodrik, 2012; Bednářová et al., 2013). У насекомых реакции антиокислительного стресса, по-видимому, регулируются преимущественно АКГ. Очевидное участие АКГ в контроле защиты против окислительного стресса является типичным примером эндокринной регуляции такого ответа. Механизмы действия АКГ при окислительном стрессе, понимание которых необходимо для детального выяснения роли АКГ в стресс-реакции, до сих пор мало изучены. Тем не менее интенсивные исследования, преимущественно на модели *D. melanogaster*, могут принести интересные данные в ближайшем будущем. В настоящее время легко доступны мутанты *D. melanogaster*, созданные с помощью методов генной инженерии, перепроизводством или дефицитом гормонов стресса, подавлением экспрессии рецепторов этих гормонов. Они представляют собой мощный инструмент для изучения ответа на стресс (Kodrik et al., 2015).

Несколько нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, связаны с развитием окислительного стресса и интенсивно изучаются. Большая часть данных получена на позвоночных животных, однако ряд работ за последние несколько лет показал, что насекомые представляют собой важную модель для исследования окислительного стресса. Кроме того, результаты, полученные на насекомых, очень часто универсальны и могут способствовать выяснению важ-

нейших механизмов окислительного стресса у животных, в том числе и у людей (Kodrik et al., 2015).

Одним из направлений исследований С.А. Адамо (Adamo, 2012, 2014, 2017a, b; Adamo et al., 2013, 2017) является изучение стресс-зависимой иммунной функции с использованием моделей насекомых. Показано, что у насекомых медиаторы стрессового ответа (т.е. гормоны стресса) меняют иммунный статус насекомого, в том числе частично перераспределяя молекулярные ресурсы в пользу двигательной активности, интенсификация которой необходима для борьбы или бегства. Например, белки переноса липидов участвуют как в стрессе, так и в иммунных реакциях, что приводит к снижению устойчивости к болезням, когда эти белки переключаются на стресс-ответ. Октопамин необходим также как для развития стресс-реакции, так и для активации иммунного ответа (фагоцитоза) (Adamo, 2014, 2017a). Однако С.А. Адамо полагает, что при стрессе у насекомых происходит, скорее, реконфигурация иммунной системы, обеспечивающая снижение затрат на иммунный ответ, чем прямой обмен ресурсами между этими двумя защитными системами организма (Adamo, 2017a). Так, стресс-реакция индуцирует провоспалительное состояние, которое, по мнению автора, усиливает ранний иммунный ответ.

Сходство в нейрoхимических и физиологических изменениях у беспозвоночных и позвоночных в ответ на стрессорное воздействие показывает, что реакция на стрессор – это совокупность древних, сохраненных в эволюции механизмов. Изучение стресс-реакции у насекомых важно как в теоретическом плане – определяется конвергентность путей эволюции адаптивных преобразований у таких далеко отстоящих друг от друга таксонов, как насекомые и млекопитающие, так и в практическом – закономерности механизма этой реакции можно использовать при моделировании наследственных или приобретенных заболеваний человека, разработке методов разведения хозяйственно ценных насекомых и способов борьбы с насекомыми-вредителями.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0002. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adamo S.A. The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. *Horm. Behav.* 2012;62:324-330.
- Adamo S.A. The stress response and immune system share, borrow, and reconfigure their physiological network elements: evidence from the insects. *Horm. Behav.* 2017a;88:25-30. DOI 10.1016/j.yhbeh.2016.10.003.
- Adamo S.A. Stress responses sculpt the insect immune system, allowing for better defense in an ever – changing world. *Dev. Comp. Immunol.* 2017b;66:24-32. DOI 10.1016/j.dci.2016.06.005.
- Adamo S.A. The effects of stress hormones on immune function may be vital for the adaptive reconfiguration of the immune system during fight-or-flight behavior. *Integr. Comp. Biol.* 2014;54(3):419-426. DOI 10.1093/icb/ucu005.
- Adamo S.A., Easy R., Kovalko I., MacDonald J., McKeen A., Swannburg T., Turnbull K.F., Reeve C. Predator stress-induced immunosuppression: trade-off, immune redistribution or immune reconfiguration? *J. Exp. Biol.* 2017;220:868-875. DOI 10.1242/jeb.153320.
- Adamo S.A., Kovalko I., Mosher B. The behavioural effects of predator-induced stress responses in the cricket (*Gryllus texensis*): the upside of the stress response. *J. Exp. Biol.* 2013;216:4608-4614.
- Ahmad S. Oxidative stress from environmental pollutants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1995;29:135-157. DOI 10.1002/arch.940290205.
- Apchel V.Ya., Tsygan V.N. Stress i stressoustoychivost cheloveka [Stress and stress resistance in a human]. Saint-Petersburg: VMA Publ., 1999. (in Russian)
- Bednářová A., Krishnan N., Cheng I.-C., Večeřa J., Lee H.-J., Kodrik D. Adipokinetic hormone counteracts oxidative stress elicited in insects by hydrogen peroxide: *in vivo* and *in vitro* study. *Physiol. Entomol.* 2013;38:54-62. DOI 10.1111/phen.12008.
- Bendena W.G., Donly B.C., Tobe S.S. Allatostatins: A growing family of neuropeptides with structural and functional diversity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999;897:311-329.
- Ben'kovskaya G.V., Leontyeva T.L., Udalov M.B. Resistance of the Colorado beetle to insecticides in the Southern Ural. *Agrokhimiya = Agrochemistry.* 2008;8:55-59. (in Russian)
- Ben'kovskaya G.V., Nikolenko A.G., Saltykova E.S., Ishmuratova N.M., Kharisov R.Ya., Ishmuratov G.Yu. The adaptogenic effect of Biosil on the honey bee and house fly. *Agrokhimiya = Agrochemistry.* 2005;3:74-78. (in Russian)
- Ben'kovskaya G.V., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Effect of methoprene on the tolerance of heat shock in the ontogenesis of the Colorado beetle. *Agrokhimiya = Agrochemistry.* 2000;12:58-61. (in Russian)
- Ben'kovskaya G.V., Sokolyanskaya M.P. Sensitivity to thermal stress in adult house flies of laboratory strains selected by insecticides and abiotic factors. *Agrokhimiya = Agrochemistry.* 2008;3:52-56. (in Russian)
- Ben'kovskaya G.V., Udalov M.B., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Phenogenetic polymorphism of the Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say and its sensitivity to insecticides in Bashkiria. *Agrokhimiya = Agrochemistry.* 2004;12:23-28. (in Russian)
- Bi J.L., Felton G.W. Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 1995;21:1511-1530. DOI 10.1007/BF02035149.
- Bogus M.I., Cymborowski B. Chilled *Galleria mellonella* larvae: Mechanism of supernumerary moulting. *Physiol. Entomol.* 1981;6:343-348.
- Bogus M.I., Wisniewski J.R., Cymborowski B. Effect of injury to the neuroendocrine system of last instar larvae of *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 1986;32:1011-1018.
- Cannon W.B. The Wisdom of the Body. N. Y.: W.W. Norton, 1932.
- Chentsova N.A., Alekseev A.A., Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. Effect of octopamine on the activity of ecdysone monooxygenase in *Drosophila*. *Doklady AN = Proceedings of the Academy of Sciences.* 2007;415:559-561. (in Russian)
- Chernysh S.I. Response of the neuroendocrine system on the damaging effects. *Trudy Vsesoyuznogo entomologicheskogo obshchestva = Proceedings of the Russian Entomological Society.* 1983;64:118-127. (in Russian)
- Chernysh S.I. Neuroendocrine system in insect stress. Eds. J. Ivanovic, M. Jankovic-Hladni. *Hormones and Metabolism in Insect Stress.* Boca Raton: CRC Press, 1991;69-98.
- Chertkova E.A. A change in the dopamine level in the hemolymph of larvae of the cabbage scoop *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) and the Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) in various diseases. New knowledge about parasites. *Materialy V Mezhhregionalnoy konferentsii "Parazitologicheskie issledovaniya v Sibiri i na Dalnem Vostoke"* [Proceed-

- ings of the V Transregional Conference "Parasitological Studies in Siberia and the Far East". Novosibirsk, 2015;131-132. (in Russian)
- Cymborowski B. Effect of cooling stress on endocrine events in *Galleria mellonella*. Endocrinological frontiers in physiological insect ecology. Wrocław. 1988;1:203-212.
- Cymborowski B., Bogus M.I. Juvenilizing effect of cooling on *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 1976;22:669-672.
- Cymborowski B., Bogus M., Beckage N.E., Williams C.M., Riddiford L.M. Juvenile hormone titres and metabolism during starvation-induced supernumerary larval moulting of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L. J. Insect Physiol. 1982;28:129-135.
- Davenport A.K., Evans P.D. Stress-induced changes in octopamine levels of insect hemolymph. Insect Biochem. 1984;14:135-150.
- Evans P.D. Octopamine. Eds. G.A. Kerkut, L.I. Gilbert. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press, 1985;11:499-538.
- Even N., Devaud J.M., Barron A.B. General stress responses in the honey bee. Insects. 2012;3:1271-1298. DOI 10.3390/insects3041271.
- Gayfullina L.R., Saltykova E.S., Ben'kovskaya G.V., Nikolenko A.G. Immune responses of larvae and imagoes of the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) to a biological potato protectant. Agrokhimiya = Agrochemistry. 2004;9:1-7. (in Russian)
- Gorizontov P.D. Rezistentnost i porazhenie. Voprosy obshchey patologii [The resistance and damage. Issues of general pathology]. Patologicheskaya fiziologiya ekstremalnykh sostoyaniy [Pathological physiology of extreme conditions]. Moscow: Meditsina Publ., 1973. (in Russian)
- Gruntenko N.E. Stress i razmnozhenie nasekomykh: gormonalnyy kontrol [Stress and Reproduction of Insects: Hormonal Control]. Novosibirsk; Moscow: KMK Publ., 2008. (in Russian)
- Gruntenko N.E., Bogomolova E.V., Adonyeva N.V., Karpova E.K., Menshanov P.N., Alekseev A.A., Romanova I.V., Li S., Rauschenbach I.Y. Decrease in juvenile hormone level as a result of genetic ablation of the *corpus allatum* cells affects the synthesis and metabolism of stress related hormones in *Drosophila*. J. Insect Physiol. 2012;58:49-55.
- Gruntenko N.E., Bownes M., Terashima J., Suchanova M.Zh., Rauschenbach I.Yu. Heat stress affects oogenesis differently in wild type *Drosophila virilis* and a mutant with altered juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone levels. Insect Mol. Biol. 2003a;12:393-404.
- Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V., Bownes M., Segal D., Adonyeva N.V., Rauschenbach I.Yu. Stress response in a juvenile hormone deficient *Drosophila melanogaster* mutant apterous^{56f}. Insect Mol. Biol. 2003b;12:353-363.
- Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V., Karpova E.K., Glazko G.V., Monastirioti M., Rauschenbach I.Yu. The effect of mutations altering biogenic amine metabolism in *Drosophila* on viability and the response to heat stress. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2004;55:55-67.
- Gruntenko N.E., Karpova E.K., Adonyeva N.V., Chentsova N.A., Faddeeva N.V., Alekseev A.A., Rauschenbach I.Yu. Juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and dopamine interaction in *Drosophila virilis* reproduction under normal and nutritional stress conditions. J. Insect Physiol. 2005a;51:417-425.
- Gruntenko N.E., Karpova E.K., Alekseev A.A., Chentsova N.A., Saprykina Z.V., Bownes M., Rauschenbach I.Yu. Effects of dopamine on juvenile hormone metabolism and fitness in *Drosophila virilis*. J. Insect Physiol. 2005b;51:959-968.
- Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. Interplay of juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. J. Insect. Physiol. 2008; 54:902-908.
- Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster*: A mini-review. Gen. Comp. Endocrinol. 2017. DOI 10.1016/j.ygcen.2017.05.019.
- Gruntenko N.E., Wen D., Karpova E.K., Adonyeva N.V., Liu Y., He Q., Faddeeva N.V., Fomin A.S., Li S., Rauschenbach I.Yu. Altered juvenile hormone metabolism, reproduction and stress response in *Drosophila* adults with genetic ablation of the *corpus allatum* cells. Insect Biochem. Mol. Biol. 2010;40: 891-897.
- Gruntenko N.E., Wilson T.G., Monastirioti M., Rauschenbach I.Yu. Stress-reactivity and juvenile hormone degradation in *Drosophila melanogaster* strains having stress-related mutations. Insect Biochem. Mol. Biol. 2000;30:775-783.
- Harris J.W., Woodring J. Effects of stress age, season and source colony on the level of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. J. Insect Physiol. 1992;38:29-35.
- Hirashima A., Eto M. Chemical-induced changes in the biogenic amine levels of *Periplaneta americana* L. Pestic. Biochem. Physiol. 1993;46:131-140.
- Hirashima A., Nagano T., Eto M. Effect of various insecticides on the larval growth and biogenic amine levels of *Tribolium castaneum* Herbst. Comp. Biochem. Physiol. 1994;107C:393-398.
- Hirashima A., Rauschenbach I.Yu., Sukhanova M.Jh. Ecdysteroids in stress responsive and nonresponsive *Drosophila virilis* lines under stress conditions. Biosci. Biotech. Biochem. 2000;64:2657-2662.
- Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Gélouën A., Even P.C., Cervera P., Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature. 2003;42: 182-187.
- Ivanović J., Janković-Hladni M., Milanović M.P. Possible role of neurosecretory cells, Type A in response of *Morimus funereus* larvae to the effect of temperature. J. Therm. Biol. 1975;1:53-57.
- Ivanović J., Janković-Hladni M., Stanić V., Milanović M.P., Nenadović V. Possible role of neurohormones in the process of acclimatization and acclimation in *Morimus funereus* larvae (Insecta). I. Changes in the neuroendocrine system and target organs (midgut, hemolymph) during the annual cycle. Comp. Biochem. Physiol. 1979;80A:107-112.
- Ivanović J., Janković-Hladni M., Stanić V., Kalafatć D. Differences in the sensitivity of protocerebral neurosecretory cells arising from the effect of different factors in *Morimus funereus* larvae. Comp. Biochem. Physiol. 1985;80A:107-113.
- Ivanović J., Janković-Hladni M., Stanić V., Nenadović V., Frušić M. The role of neurosecretion and metabolism in development of an oligophagous feeding habit in *Morimus funereus* larvae (Col., Cerambycidae). Comp. Biochem. Physiol. 1989;74:189-197.
- James V. Psihologiya [Psychology]. Saint-Petersburg, 1905. (in Russian)
- Janković-Hladni M. Hormones and metabolism in insect stress (Historical survey). Eds. J. Ivanovic, M.I. Jankovic-Hladni. Hormones and Metabolism in Insect Stress. Boca Raton: CRS Press, 1991;5-27.
- Janković-Hladni M., Chen C.A., Ivanović J., Djordjević S., Stanić V., Perić Mataruga V., Frušić M. Effects of diet and temperature on *Morimus funereus* larvae hemolymph cation concentrations. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1992;20:205-214.
- Janković-Hladni M., Ivanović J., Nenadović V., Stanić V. The selective response of the protocerebral neurosecretory cells of the *Cerambyx cerdo* larvae to the effect of different factors. Comp. Biochem. Physiol. 1983;74A:131-136.
- Johnson E.C., White M.P. Stressed-Out Insects: Hormonal Actions and Behavioral Modifications. Eds. D.W. Pfaff, A.P. Arnold, S.E. Fahrenbach, A.M. Etgen, R.T. Rubin. Hormones, Brain and Behavior. San Diego: Academic Press, 2009;1069-1096.
- Kitaev-Smyk L.A. Psihologiya stressa [Psychology of Stress]. Moscow: Nauka Publ., 1983. (in Russian)
- Kodrík D., Bednářová A., Zemanová M., Krishnan N. Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects – an update. Int. J. Mol. Sci. 2015;16:25788-25816.
- Kositskiy G.I., Smirnov V.M. Nervnaya sistema i "stress" (o printsipe dominants v patologii) [The Nervous System and 'Stress' (The Principle of Dominance in Pathology)]. Moscow: Nauka Publ., 1970. (in Russian)
- Kramer S.J., Toschi A., Miller C.A., Kataoka H., Quistad G.B., Li J.P., Carney R.L., Schooley D.A. Identification of an allastatin from the

- tabacco hornworm *Manduca sexta*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991;88:9458-9462.
- Krishnan N., Kodrik D. Endocrine control of oxidative stress in insects. Eds T. Farooqui, A.A. Farooqui. Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2012;261-270.
- Lalouette L., Williams C.M., Hervant F., Sinclair B.J., Renault D. Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. Comp. Biochem. Physiol. 2011;158:229-234. DOI 10.1016/j.cbpa.2010.11.007.
- Lawrence P.O. Hormonal interactions between parasitoids and hosts: adaptation to stress? Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology. Wrocław: Tech. Univ. Press, 1988;423-435.
- Leković S., Lazarević J., Nenadović V., Ivanović J. The effect of heat stress on the activity of A1 and A2 neurosecretory neurons of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. Eur. J. Entomol. 2001;98:13-18.
- McCaleb D.C., Kumaran A.K. Control of juvenile hormone esterase activity in *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 1980;26:171-177.
- Meerson F.Z. Adaptatsiya, stress i profilaktika [Adaptation, Stress and Prevention]. Moscow: Nauka Publ., 1981. (in Russian)
- Meng J.-Y., Zhang C.-Y., Zhu F., Wang X.-P., Lei C.-L. Ultraviolet light-induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults. J. Insect Physiol. 2009;55:588-592. DOI 10.1016/j.jinsphys.2009.03.003.
- Möbius P., Penzlin H. Stress-induced release of octopamine in the American cockroach *Periplaneta americana* L. Acta Biol. Hung. 1993;44:45-50.
- Mrdaković M., Ilijin L., Vlahović M., Janković-Tomanić M., Perić Mataruga V., Lazarević J., Nenadović V. The effects of different constant temperatures on the activity of *corpora allata* in *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. Arch. Biol. Sci. 2003;55:21-22.
- Neckameyer W.S., Weinstein J.S. Stress affects dopaminergic signaling pathways in *Drosophila melanogaster*. Stress. 2005;8:117-131.
- O'Kasha A.Y.K. Effect of sub-lethal high temperature on insect, *Rhodnius prolixus* (Stal). I. Induction of delayed moulting and defects. J. Exp. Biol. 1968;48:455-463.
- Perić-Mataruga V., Lazarević J., Nenadović V. A possible role for the dorsolateral protocerebral neurosecretory neurons in the trophic adaptations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). Eur. J. Entomol. 2001;98:257-264.
- Pogodaev K.I. K biologicheskim osnovam "stressa" i "adaptatsionnogo sindroma". [Biological foundations of "stress" and "the adaptation syndrome"]. Aktualnye problemy stressa [Topical Issues in Stress]. Chişinău: Shtiintsa Publ., 1976. (in Russian)
- Pszczolkowski M.A., Chiang A.S. Effects of chilling stress on allatal growth and juvenile hormone synthesis in the cockroach, *Diploptera punctata*. J. Insect Physiol. 2000;46:923-931.
- Rauschenbach I.Yu. Neuroendokrinnaia regulatsiya razvitiya nasekomykh v usloviyakh stressa: Genetiko-fiziologicheskie aspekty [Neuroendocrine Regulation of Insect Development under Stress: Genetic and Physiological Aspects]. Novosibirsk: Nauka Publ., 1990. (in Russian)
- Rauschenbach I.Yu. Stress-response in insects: mechanism, genetic control, role in adaptation. Genetika = Genetics (Moscow). 1997;33:1110-1118. (in Russian)
- Rauschenbach I.Y., Budker V.G., Korochkin L.I. Pupal esterase of *D. virilis* splits juvenile hormone. Dros. Inf. Serv. 1983a;59:104.
- Rauschenbach I.Yu., Karpova E.K., Adonyeva N.V., Andreenkova O.V., Faddeeva N.V., Burdina E.V., Alekseev A.A., Menshanov P.N., Gruntenko N.E. Disruption of insulin signalling affects the neuroendocrine stress reaction in *Drosophila* females. J. Exp. Biol. 2014;217:1-9.
- Rauschenbach I.Y., Lukashina N.S., Korochkin L.I. Role of pupal esterase in the regulation of the *D. virilis* stocks differing in response to high temperature. Dev. Genet. 1980;1:295-310.
- Rauschenbach I.Y., Lukashina N.S., Korochkin L.I. Genetic of esterase in *Drosophila*. VII. The genetic control of the activity level of the JH-esterase and heat-resistance in *Drosophila virilis* under high temperature. Biochem. Genet. 1983b;21:253-266.
- Rauschenbach I.Yu., Lukashina N.S., Korochkin L.I. Genetic-endocrine regulation of the development of *Drosophila* in extreme environmental conditions: III. Effect of high culture density on survival, hormonal status and activity of *Drosophila virilis* JH-esterase. Genetika = Genetics (Moscow). 1983;19:1439-1445. (in Russian)
- Rauschenbach I.Y., Lukashina N.S., Maksimovsky L.F., Korochkin L.I. Stress-like reaction of *Drosophila* to adverse environmental factors. J. Comp. Physiol. B. 1987;157:519-531.
- Rauschenbach I.Yu., Sukhanova M.J., Hirashima A., Sutsugu E., Kuan E. Role of the ecdysteroid system in the regulation of *Drosophila* reproduction under environmental stress. Doklady RAN = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. 2000;375:568-570. (in Russian)
- Richard D.S., Applebaum S.W., Gilbert L.I. Allatostatic regulation of juvenile hormone production in vitro by the ring gland of *Drosophila melanogaster*. Mol. Cell. Endocrinol. 1990;68:153-161.
- Saltykova E.S., Ben'kovskaya G.V., Gayfullina L.R., Novitskaya O.P., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Reaction of individual physiological barriers to bacterial infection in various races of the honey bee *Apis mellifera*. Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2005;41(3):254-258. (in Russian)
- Selye H. Stress bez distressa [Stress without Distress]. Moscow: Progress Publ., 1979. (in Russian)
- Selye H. Ot mechty k otkrytiyu [From Dream to Discovery]. Moscow: Progress Publ., 1987. (in Russian)
- Singh H., Pandey P.N. Experimental assessment of effects of larval crowding on development and reproduction in *Diacrisia obliqua* Walker (Lep., Arctiidae). Biochem. Exp. Biol. 1980;16:157-164.
- Sokolyanskaya M.P., Ben'kovskaya G.V., Nikolenko A.G. Dynamics of the formation of resistance to various stress factors in housefly larvae. Agrokhimiya = Agrochemistry. 2005;9:70-75.
- Stay B., Fairbairn S., Yu C.G. Role of allatostins in the regulation of juvenile hormone synthesis. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1996;32:287-297.
- Sudakov K.V. Specific mechanisms of emotional stress. Third Symp. on Catecholamines and other Neurotransmitters in Stress, Smolenica Castle, Czechoslovakia. 1983;87.
- Tauchman S.J., Lorch J.M., Orth A.P., Goodman W.G. Effects of stress on the hemolymph juvenile hormone binding protein titres of *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 2007;37:847-854.
- Tobe S.S., Stay B. Structure and regulation of the *corpus allatum*. Adv. Insect Physiol. 1985;18:305-432.
- Tyshchenko V.P., Fiziologiya nasekomykh [Physiology of Insects]. Moscow: Vysshaya shkola Publ., 1986. (in Russian)
- Velki M., Kodrik D., Večeřa J., Hackenberger B.K., Socha R. Oxidative stress elicited by insecticides: A role for the adipokinetic hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 2011;172:77-84. DOI 10.1016/j.ygcen.2010.12.009.
- Vigas M. Problem of definition of stress stimulus and specificity of stress response. Third Symp. on Catecholamines and other Neurotransmitters in Stress, Smolenica Castle, Czechoslovakia, 1983;94.
- Viru A.A. Gormonalnye mekhanizmy adaptatsii i trenirovki [Hormonal Mechanisms of Adaptation and Training]. Leningrad: Nauka Publ., 1981. (in Russian)
- Wigglesworth V.B. Hormone balance and the control of metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). J. Exp. Biol. 1952;29:620-631.
- Wigglesworth V.B. High temperature and arrested growth in *Rhodnius*: Quantitative requirements for ecdysone. J. Exp. Biol. 1955;32:649-655.
- Wundt B. Osnovy fiziologicheskoy psikhologii. Chuvstva i affekty. [Principles of Physiological Psychology. Feelings and Passions]. Leningrad, 1980;55(3). (in Russian)
- Zhao H.W., Haddad G.G. Review: Hypoxic and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. Placenta. 2011;32:S104-S108. DOI 10.1016/j.placenta.2010.11.017.



Половые различия молекулярных механизмов чувствительности к инсулину у молодых и взрослых мышей C57BL/6J

Т.В. Яковлева¹✉, А.Ю. Казанцева¹, Е.Н. Макарова¹, Н.М. Бажан^{1, 2}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

В патогенезе сахарного диабета 2-го типа важную роль играет снижение чувствительности к инсулину. Существуют половые различия в развитии метаболических нарушений: самцы мышей по сравнению с самками более склонны к развитию с возрастом гиперинсулинемии и к снижению толерантности к глюкозе при содержании на высококалорийной диете. Целью данной работы было исследовать экспрессию генов трансдукции сигнала инсулина у мышей разного пола и возраста. Исследования проводили на мышах линии C57BL/6J. Оценку экспрессии генов трансдукции сигнала инсулина в печени, мышцах и в жировой ткани выполняли методом ПЦР в реальном времени. Показано, что независимо от возраста чувствительность к инсулину у самок выше, чем у самцов, поскольку уровень глюкозы в плазме крови у самок и самцов не различается, тогда как уровень инсулина у самок ниже, чем у самцов. С возрастом у самок повышается толерантность к глюкозе, и в возрасте 30 недель толерантность к глюкозе у самок выше, чем у самцов. Показано, что пол и возраст влияют на уровень экспрессии генов трансдукции сигнала инсулина. В возрасте 10 недель существуют половые различия по уровню мРНК *Pik3cd* в печени, мРНК *Irs1* в мышцах, мРНК *Irs1* и *Slc2a4* в жировой ткани, в возрасте 30 недель – по уровню мРНК *Irs2* и *Pik3cd* в печени, мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4* в мышцах, мРНК *Insr* и *Pik3cd* в жировой ткани. В возрасте 10 недель во всех тканях экспрессия генов выше у самок, чем у самцов. В возрасте 30 недель у самок экспрессия генов в печени выше, а в мышцах и жировой ткани ниже, чем у самцов. С возрастом у самцов снижается уровень мРНК *Insr* в печени и мышцах и мРНК *Pik3cd* в жировой ткани, повышается уровень мРНК *Pik3cd* в мышцах. У самок с возрастом снижается уровень мРНК *Irs1* в мышцах и мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4* в жировой ткани. Таким образом, молекулярной основой половых различий и возрастных изменений чувствительности к инсулину может быть изменение экспрессии генов трансдукции сигнала инсулина в тканях-мишенях.

Ключевые слова: половые различия; толерантность к глюкозе; чувствительность к инсулину; мРНК; *Insr*; *Irs1/2*; *Pik3cd*; *Slc2a2/4*; real-time ПЦР; мыши линии C57BL/6J.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Яковлева Т.В., Казанцева А.Ю., Макарова Е.Н., Бажан Н.М. Половые различия молекулярных механизмов чувствительности к инсулину у молодых и взрослых мышей C57BL/6J. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):833-840. DOI 10.18699/VJ17.303

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yakovleva T.V., Kazantseva A.Yu., Makarova E.N., Bazhan N.M. Sex differences of molecular mechanisms of insulin sensitivity in young and adult C57BL/6J mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):833-840. DOI 10.18699/VJ17.303 (in Russian)

Received 30.09.2017
Accepted for publication 25.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: jakov@bionet.nsc.ru

Sex differences of molecular mechanisms of insulin sensitivity in young and adult C57BL/6J mice

T.V. Yakovleva¹✉, A.Yu. Kazantseva¹,
E.N. Makarova¹, N.M. Bazhan^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Reduced insulin sensitivity plays an important role in the pathogenesis of type II diabetes. There are sex differences in the development of metabolic disorders. The aim of this work was to investigate the insulin signal transduction gene expression in mice of different sex and age. Male and female C57BL/6J mice were used in our studies. Gene expression was assayed by RT-PCR. It was shown that insulin sensitivity in females was higher than in males regardless of age because the level of glucose in blood plasma of females does not differ from that in males, whereas female insulin levels were lower than male insulin levels. Female glucose tolerance increased with age, and glucose tolerance was higher in females than in males at the age of 30 weeks. It was shown that sex and age affect the expressions of insulin signal transduction genes. It was shown that there are sex differences in the levels of mRNA *Pik3cd* in the liver, in the levels of mRNA *Irs1* in the muscle, in the levels of mRNA *Irs1* and *Slc2a4* in adipose tissue at the age of 10 weeks, and there are sex differences in the levels of mRNA *Irs2* and *Pik3cd* in the liver, in the levels mRNA *Pik3cd* and *Slc2a4* in the muscle, in the levels mRNA *Insr* and *Pik3cd* in adipose tissue at the age of 30 weeks. In young animals, the expression of the genes was higher in females than in males in all tissues. In adult animals, the expression of the genes in the liver was higher in females than in males, the expression of the genes in muscle and adipose tissues were lower in females than in males. In males, the levels of mRNA *Insr* in the liver and muscles and mRNA *Pik3cd* in adipose tissue decreased with age, and the level of mRNA *Pik3cd* in muscles increased with age. In females, the levels of mRNA *Irs1* in muscle and mRNA *Pik3cd* and *Slc2a4* in adipose tissue decreased with age. Thus the molecular basis of sex differences and age-related changes in insulin sensitivity may be a change in expressions of insulin signal transduction genes in the target tissues.

Key words: sex differences; glucose tolerance; insulin sensitivity; mRNA; *Insr*; *Irs1/2*; *Pik3cd*; *Slc2a2/4*; real-time PCR, mouse C57BL/6J.

В настоящее время в патогенезе диабета второго типа ведущую роль отводят развитию инсулинорезистентности (Corrps, White, 2012), однако механизм развития инсулинорезистентности изучен недостаточно. Известно, что существуют половые различия в развитии метаболических нарушений – у женщин нечувствительность к инсулину встречается реже, чем у мужчин (Tripathy et al., 2000). На лабораторных животных показано, что самки мышей менее склонны к развитию гиперинсулинемии и к снижению толерантности к глюкозе (Pettersson et al., 2012; Sentil Kumar et al., 2014), кроме того, при содержании на жирной диете у самок мышей, в отличие от самцов, не снижается чувствительность к инсулину в печени, не развивается голодная гипергликемия (Akoum et al., 2011) и не снижается толерантность к глюкозе (Ganz et al., 2014). Различия по чувствительности к инсулину могут быть обусловлены половыми различиями в синтезе и активности белков трансдукции сигнала инсулина. Так, у мышей обнаружены половые различия (у самок выше, чем у самцов) по уровню белков рецептора инсулина (INSR), субстрата рецептора инсулина (IRS1), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и транспортера глюкозы четвертого типа (GLUT4) в скелетных мышцах и в жировой ткани (Macotela et al., 2009; Shelley et al., 2009; Grove et al., 2010; Oh et al., 2011), а также по уровню стимулированного инсулином фосфорилирования протеинкиназы В (АКТ) в адипоцитах (Macotela et al., 2009). На сегодняшний день практически нет данных о том, различаются ли самцы и самки по экспрессии генов, кодирующих белки трансдукции сигнала инсулина. Показано, что у мышей в адипоцитах уровень мРНК *Insr* у самцов и самок не различается, уровень мРНК *Slc2a4* (ген, кодирующий GLUT4) у самок выше, чем у самцов (Macotela et al., 2009).

Известно, что показатели чувствительности к инсулину в постпубертатный период меняются с возрастом. У мышей C57BL/6J в период с 12 по 24 неделю у самок и с 12 по 36 неделю у самцов толерантность к глюкозе не меняется, но снижается уровень глюкозы в крови после голодания и показатель HOMA-IR (homeostasis model assessment insulin resistance) (Sairam et al., 2006; Hinder et al., 2017). Аналогично у самцов крыс Wistar в период с 4 по 24 неделю показано достоверное снижение показателя HOMA-IR, уровня триглицеридов в печени, уровней глюкозы и инсулина в крови, повышение чувствительности к инсулину в тесте толерантности (Sakamuri et al., 2016). При этом сравнение молекулярного механизма передачи сигнала инсулина у животных разных возрастов не проводили.

Целью данной работы было исследовать молекулярные сигнальные пути, определяющие чувствительность к инсулину, у мышей разного пола и возраста. Для этого мы сравнивали уровень мРНК генов, кодирующих белки трансдукции инсулинового сигнала, в печени, в мышечной и жировой тканях у самок и самцов мышей в возрасте 10 недель (молодые) и 30 недель (взрослые). Полученные данные позволяют предположить, что в основе половых различий чувствительности к инсулину, а также повышения с возрастом у самок толерантности к глюкозе лежит активация транскрипции генов, кодирующих белки трансдукции инсулинового сигнала, в печени – поскольку

у самок с возрастом повышается уровень мРНК *Irs2* в печени, и в возрасте 30 недель уровни мРНК *Irs2* и *Pik3cd* (каталитической субъединицы PI3K) в печени у самок выше, чем у самцов.

Материалы и методы

Животные. Эксперимент проводили на мышах C57BL/6J. Животных разводили и содержали в виварии Института цитологии и генетики СО РАН в условиях постоянного светового режима (12:12) и свободного доступа к воде и пище (Aller Petfood, Россия) при температуре 22 ± 2 °C. При работе соблюдали биоэтические нормы. Животных отсаживали от матерей в возрасте 4 недель по 5 мышей одного пола в клетку. Часть животных рассаживали по одному в возрасте 6 недель, остальных – в возрасте 26 недель. Через две недели индивидуального содержания часть животных тестировали в глюкозо-толерантном тесте (ГТТ), других – в инсулино-толерантном тесте (ИТТ). Через две недели после тестирования, соответственно в возрасте 10 и 30 недель, животных декапитировали утром (09:00–10:00 ч) в сытом состоянии или после ночного голодания (корм убрали накануне вечером в 18:00, оставляя свободный доступ к воде). Фазу эстрального цикла у самок не учитывали. Кровь для измерения уровня инсулина, глюкозы, триглицеридов и холестерина собирали в пробирки с 5 мкл ЭДТА, центрифугировали (4000 g, 20 мин) на холоду, плазму крови хранили при -70 °C. У сытых животных брали образцы тканей печени, абдоминального жира и мышц (*quadriceps femoris*). Образцы тканей немедленно помещали в жидкий азот и хранили там до выделения общей РНК.

Было сформировано четыре экспериментальные группы: самки – 10 недель, самцы – 10 недель, самки – 30 недель, самцы – 30 недель. Всего использовано 25 самок и 24 самца в возрасте 10 недель, 25 самок и 29 самцов в возрасте 30 недель.

Для животных всех экспериментальных групп определяли следующие показатели: вес тела, индекс веса печени и жировой ткани ($[\text{вес ткани (г)}/\text{вес тела (г)}] \times 100 \%$), концентрации глюкозы, инсулина, триглицеридов и холестерина в плазме крови в сытом и голодном состоянии, уровень глюкозы в крови в ходе ГТТ и ИТТ, уровень мРНК *Insr*, *Irs2*, *Pik3cd*, *Slc2a2* (не зависящий от инсулина транспортер второго типа) в печени, уровень мРНК *Insr*, *Irs1*, *Pik3cd*, *Slc2a4* в мышечной и жировой тканях.

Глюкозо-толерантный и инсулино-толерантный тесты. Тестирование животных проводили натощак: воду оставляли в свободном доступе, пищу убрали в 09:00, тестирование начинали в 14:00. Глюкозу вводили перорально в дозе 2 г/кг. Инсулин (протафан – синтетический аналог инсулина, Ново Нордиск А/С, Дания) вводили внутривенно в дозе 0.5 Ед/кг. Концентрацию глюкозы в крови из хвостовой вены определяли до введения глюкозы или протафана, а также через 15, 30, 60 и 120 мин после введения. Определение концентрации глюкозы в крови в ходе глюкозо-толерантного и инсулино-толерантного тестов проводили с помощью глюкометра OneTouch Select (LifeScan; Johnson and Johnson, США).

Физиологический индекс резистентности к инсулину (HOMA-IR) определяли у животных после ночного го-

лодания и рассчитывали по формуле [Уровень глюкозы в крови (ммоль/л) × Уровень инсулина в крови (нг/мл)]/22.5. Увеличение данного показателя означает снижение чувствительности к инсулину.

Реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли, используя реагент ExtraRNA (Евроген Лаб, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. 1 мкг РНК смешивали с 2.5 мкл праймера oligo-dT (Евроген Лаб, Москва, Россия, конечная концентрация праймера составила 2 мкМ) и денатурировали при 70 °С в течение 2 мин на амплификаторе «БИС» (Россия), затем добавляли 5 мкл (5х) буфера («СибЭнзим», Новосибирск, Россия), 2.5 мкл dNTP (5 мМ по каждому, «Медиген», Новосибирск, Россия) и 0.5 мкл (100 ед) M-MuLV («СибЭнзим», Новосибирск, Россия). Полученную смесь инкубировали при 42 °С в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при –20 °С.

Относительное количество мРНК генов определяли C_T-методом. ПЦР в реальном времени проводили, используя VIIA7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, США). Все реакции были выполнены с использованием реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии референсного красителя ROX («Синтол», Москва) в 96-луночных планках (MicroAMP, Applied Biosystems) согласно инструкции производителя. В качестве праймеров и зондов использовали коммерческие наборы TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США) для мышей: рецептор инсулина – *Insr*, Mm01211875_m1; субстрат инсулинового рецептора первого типа – *Irs1*, Mm01278327_m1; субстрат инсулинового рецептора второго типа – *Irs2*, Mm03038438_m1; каталитическая субъединица дельта фосфатидилинозитол-3-киназы – *Pik3cd*, Mm00435674_m1; транспортер глюкозы четвертого типа – *Slc2a4*, Mm01245502_m1; транспортер глюкозы второго типа – *Slc2a2*, Mm00446229_m1. В качестве внутреннего контроля использовали 18srRNA Endogenous Control в жировой ткани, ген бета-актина *Actb* (Mm006007938_s1) в печени и ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Gapdh* (Mm99999915_g1) в мышцах. К 1 мкл кДНК добавляли 1 мкл TaqMan Gene Expression Assays, 8 мкл реакционной смеси, 1 мкл MgCl₂ (25 мМ) и 9 мкл воды (mQ). Real-time ПЦР проводили по стандартному протоколу (Applied Biosystems): 50 °С 2 мин, 95 °С 10 мин; 45 циклов – 95 °С 15 с, 60 °С 1 мин.

Определение биохимических показателей крови. Концентрацию инсулина в плазме крови определяли ИФА-методом с помощью коммерческого набора Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (Millipore, США) согласно инструкции производителя. Чувствительность метода 0.2 нг/мл, внутри- и межгрупповые коэффициенты вариации 0.92–8.35 и 6.03–17.9 % соответственно.

Концентрации глюкозы, триглицеридов и холестерина в плазме крови определяли ферментативно-колориметрическим методом с использованием коммерческих наборов FluitestGLU, FluitestTG и FluitestHol (Analyticon, Германия) соответственно, согласно инструкции производителя. Чувствительность метода FluitestGLU – 0.08 ммоль/л, внутри- и межгрупповые коэффициенты вариации 0.45–0.67 и 1.46–1.88 % соответственно, чувствительность метода FluitestTG – 0.05 ммоль/л, внутри- и межгрупп-

повые коэффициенты вариации 0.70–1.19 и 1.14–1.62 % соответственно, чувствительность метода FluitestTG – 0.05 ммоль/л, внутри- и межгрупповые коэффициенты вариации 0.55–1.32 и 1.06–1.38 % соответственно.

Статистическая обработка результатов. Значения представлены в виде: среднее ± SEM. Результаты обрабатывали двухфакторным дисперсионным анализом (ANOVA) (фактор «пол» (самка и самец) и фактор «возраст» (10 недель и 30 недель)), апостериорные сравнения выборочных средних проводили с помощью теста Дункан (post-hoc Duncan's test).

Результаты

Метаболические показатели у животных разного пола. Дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора «пол» на вес тела ($p < 0.001$), уровень инсулина в крови в сытом состоянии ($p < 0.001$), уровень холестерина в крови в сытом состоянии и после голодания ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно) и на толерантность к глюкозе ($p < 0.01$) (рис. 1–3). Половые различия были в большей степени выражены у взрослых животных: у молодых самок уровень инсулина в сытом состоянии был ниже, а уровень триглицеридов (ТГ) после голодания – выше, чем у самцов ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test, в обоих случаях), в сытом состоянии уровень ТГ был повышен в 2.6 раза, однако различия не достигали статистической значимости; у взрослых самок уровни инсулина и холестерина в сытом состоянии, а также ТГ и холестерина после голодания были ниже ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно, post-hoc Duncan's test), тогда как толерантность к глюкозе была выше, чем у самцов ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test).

Метаболические показатели у животных разного возраста. Дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора «возраст» на вес тела ($p < 0.001$), печени ($p < 0.01$), уровень глюкозы и ТГ в крови после голодания ($p < 0.001$ и $p < 0.05$ соответственно), а также на толерантность к глюкозе ($p < 0.05$): вес тела и относительный вес печени увеличивались с возрастом; уровень глюкозы в крови после голодания с возрастом снижался; толерантность к глюкозе повышалась (рис. 3 и 4). Степень изменения показателей зависела от пола: увеличение веса тела было более выражено у самцов (8 % самки и 15 % самцы), уровень глюкозы в крови после голодания снижался у самок на 32 %, а у самцов – на 26 % ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно, post-hoc Duncan's test), относительный вес печени и толерантность к глюкозе с возрастом достоверно увеличивались только у самок ($p < 0.01$ в обоих случаях, post-hoc Duncan's test). Кроме того, уровень ТГ в крови у животных после голодания увеличивался с возрастом только у самцов (ANOVA, взаимодействие факторов «пол» × «возраст», $p < 0.01$) (см. рис. 2 и 3), тогда как у самок наблюдалась тенденция к снижению с возрастом показателя HOMA-IR на 41 % ($p = 0.08$, post-hoc Duncan's test).

Влияние фактора «пол» на уровень мРНК исследованных генов зависело от возраста и вида исследованной ткани (рис. 5). В печени показано влияние фактора «пол» на уровни мРНК *Irs2* и *Pik3cd* ($p < 0.01$ в обоих случаях), однако уровень мРНК *Pik3cd* у самок был выше, чем у

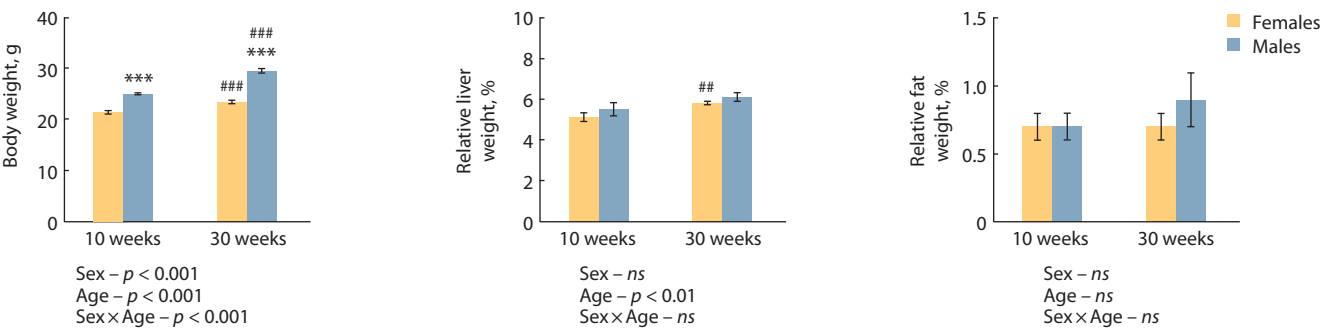


Fig. 1. Body weight and relative weights of liver and abdominal fat in females and males of mouse strain C57BL/6J at the ages of 10 and 30 weeks.
*** $p < 0.001$ vs. females; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

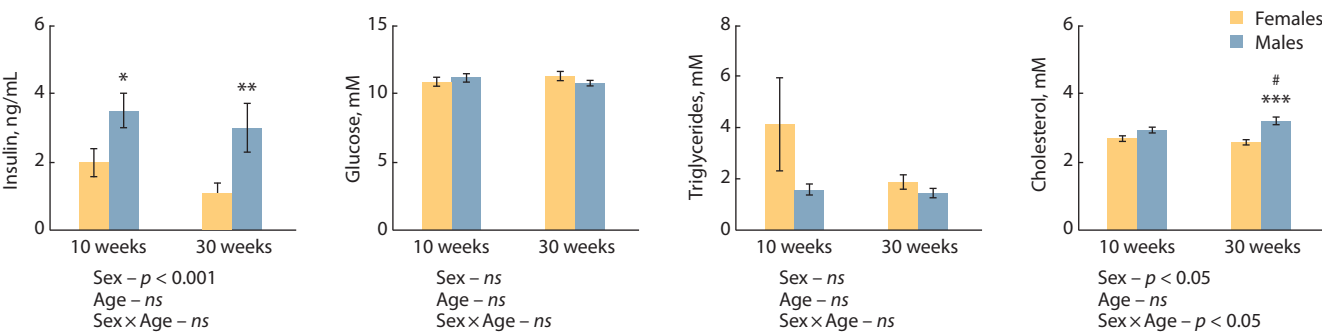


Fig. 2. Blood insulin, glucose, triglycerides, and cholesterol levels in satiate C57BL/6J females and males at the ages of 10 and 30 weeks.
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. females; # $p < 0.05$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

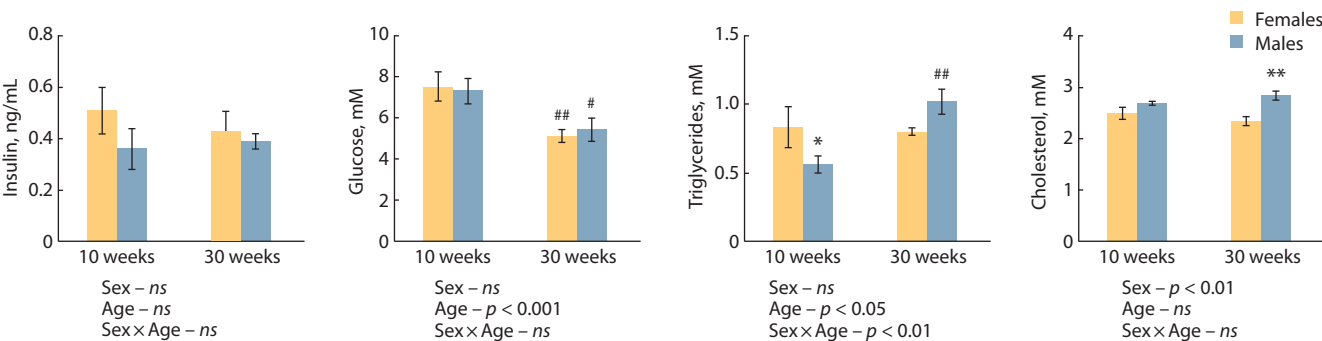


Fig. 3. Blood insulin, glucose, triglycerides, and cholesterol levels in C57BL/6J females and males at the ages of 10 and 30 weeks after overnight fasting.
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. females; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

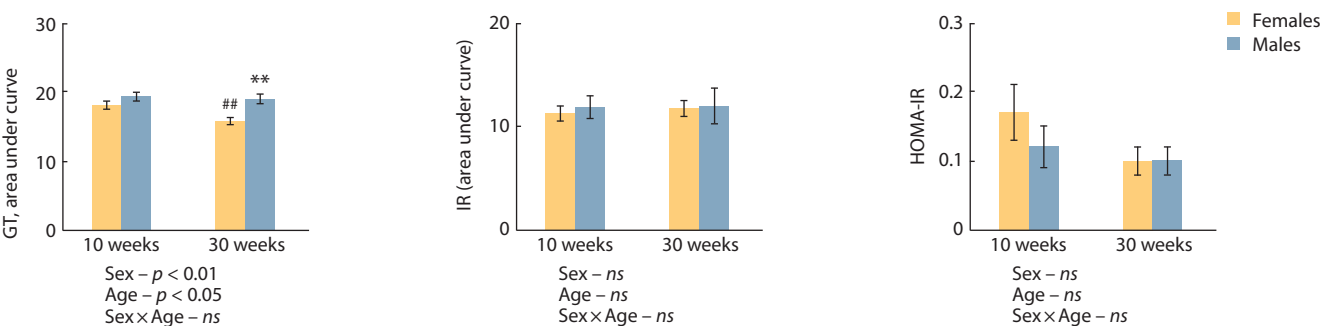


Fig. 4. Glucose tolerance (GT), insulin resistance (IR), and HOMA-IR in C57BL/6J females and males at the ages of 8 and 28 weeks.
** $p < 0.01$ vs. females; ## $p < 0.01$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

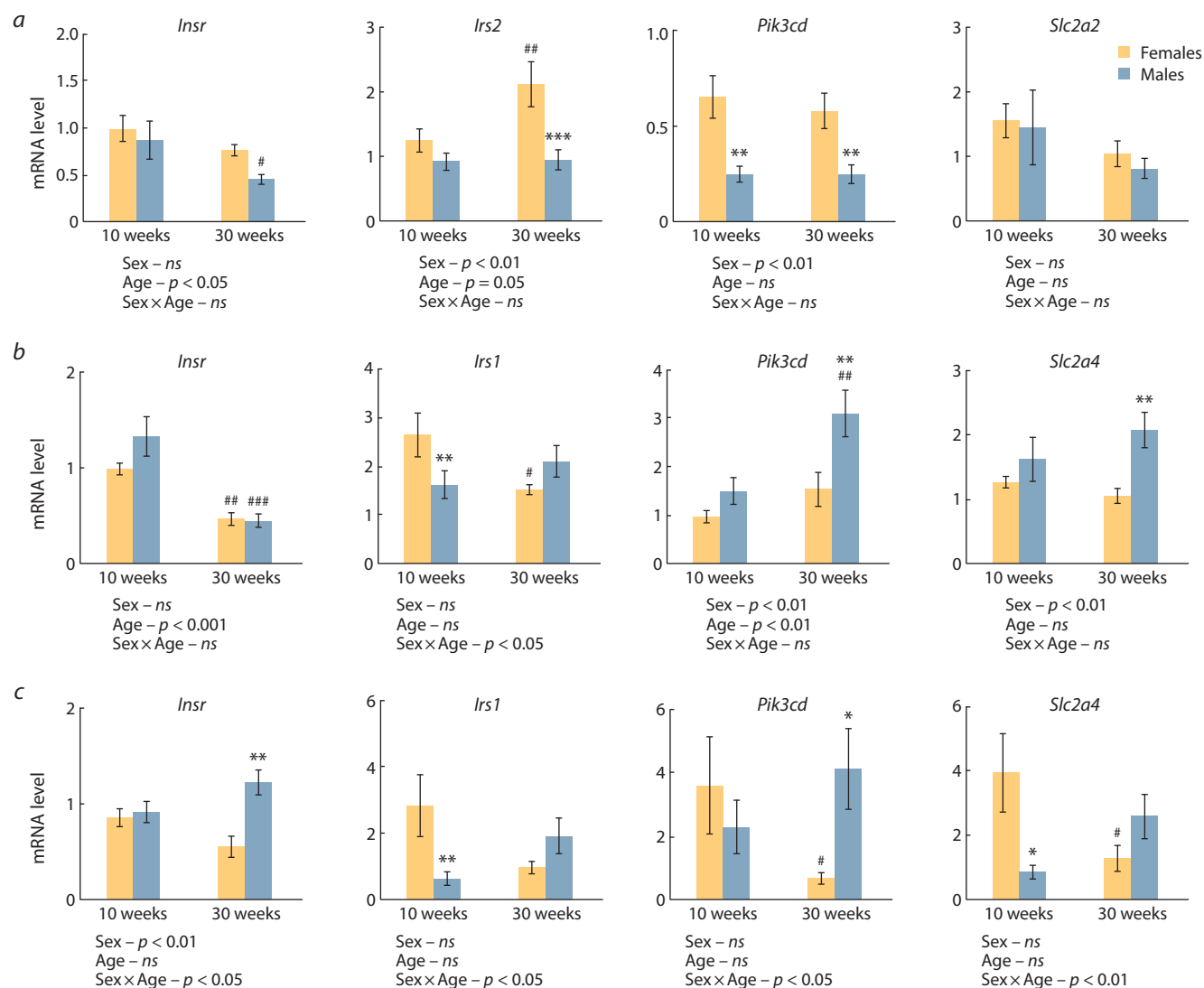


Fig. 5. Levels of *Insr*, *Irs1/2*, *Pik3cd*, and *Slc2a4* mRNAs in (a) the liver, (b) muscles, and (c) fat of C57BL/6J mice at the ages of 10 and 30 weeks.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. females; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs. 10-week same-sex animals (post hoc Duncan's test).

самцов, независимо от возраста ($p < 0.01$ в обоих случаях, post-hoc Duncan's test), тогда как уровень мРНК *Irs2* был достоверно выше, чем у самцов, только у взрослых самок ($p < 0.001$, post-hoc Duncan's test). Кроме того, у взрослых самок уровень мРНК *Insr* в печени был в 1.7 раза выше, чем у самцов, но различия не достигали статистической значимости.

В мышечной ткани показано влияние фактора «пол» на уровни мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4* ($p < 0.01$ в обоих случаях) – у самок уровни мРНК были ниже, чем у самцов, причем половые различия у взрослых животных были выражены существенно сильнее ($p < 0.01$ в обоих случаях, post-hoc Duncan's test). Кроме того, в мышечной ткани в возрасте 10 недель у самок был повышен, по сравнению с самцами, уровень мРНК *Irs1* ($p < 0.05$, взаимодействие факторов; $p < 0.01$, post-hoc Duncan's test).

В жировой ткани показано влияние фактора «пол» ($p < 0.01$) и взаимодействия факторов «пол» и «возраст»

($p < 0.05$) на уровень мРНК *Insr*, а именно: только в возрасте 30 недель уровень мРНК *Insr* у самок был ниже, чем у самцов ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test). Показано также влияние взаимодействия факторов «пол» и «возраст» на уровни мРНК *Irs1*, *Pik3cd* и *Slc2a4* в жировой ткани ($p < 0.05$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно), а именно: у молодых самок уровни мРНК этих генов были повышены по сравнению с самцами (особенно *Irs1* и *Slc2a4* – $p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно, post-hoc Duncan's test), тогда как у взрослых самок снижены (особенно *Pik3cd* – $p < 0.05$, post-hoc Duncan's test).

Изменение уровня мРНК исследованных генов с возрастом. Влияние фактора «возраст» на уровень мРНК исследованных генов существенно зависело от пола животного и вида исследованной ткани (см. рис. 5). В печени показано влияние фактора «возраст» на уровни мРНК *Insr* и *Irs2* ($p < 0.05$ в обоих случаях). У самок в большей степени выражено стимулирующее влияние фактора «воз-

раст» на уровень мРНК в печени, у самцов – ингибирующее, а именно: уровень мРНК *Insr* снижался, особенно у самцов ($p < 0.05$, post-hoc Duncan's test), тогда как уровень мРНК *Irs2* увеличивался в печени только у самок ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test; взаимодействие факторов, $p = 0.07$).

В мышечной ткани показано влияние фактора «возраст» на уровень мРНК *Insr* и *Pik3cd* ($p < 0.001$ и $p < 0.01$ соответственно) и влияние взаимодействия факторов «пол» и «возраст» на уровень мРНК *Irs1* ($p < 0.05$). У самок преобладает ингибирующее влияние фактора «возраст» на уровень мРНК в мышцах, у самцов фактор «возраст» оказывает как ингибирующее, так и стимулирующее воздействие, а именно: уровень мРНК *Insr* снижался с возрастом в равной степени у самок и самцов ($p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно, post-hoc Duncan's test); уровень мРНК *Irs1* в мышцах снижался с возрастом только у самок ($p < 0.05$, post-hoc Duncan's test); уровень мРНК *Pik3cd* достоверно увеличивался с возрастом у самцов ($p < 0.01$, post-hoc Duncan's test).

В жировой ткани показано влияние взаимодействия факторов на уровень мРНК всех исследованных генов (*Insr*, *Irs1*, *Pik3cd* – $p < 0.05$; *Slc2a4* – $p < 0.01$). Фактор «возраст» оказывал ингибирующее влияние на уровень мРНК исследованных генов у самок и стимулирующее – у самцов, а именно: у самок уровень мРНК снижался, особенно *Pik3cd* и *Slc2a4* ($p < 0.05$ в обоих случаях, post-hoc Duncan's test), у самцов – повышался, особенно *Pik3cd* ($p < 0.05$, post-hoc Duncan's test).

Обсуждение

Согласно полученным данным, молодые самки и самцы, помимо веса тела, различались по уровням инсулина и ТГ в крови. Уровень инсулина у молодых сытых самок был ниже, чем у самцов, что хорошо согласуется с повышенными уровнями мРНК *Pik3cd* в печени, *Irs1* в мышцах, *Irs1* и *Slc2a4* в жировой ткани сытых самок по сравнению с самцами. Исходя из того, что снижение/повышение уровня мРНК генов белков трансдукции сигнала инсулина может быть молекулярной основой соответственно снижения/повышения чувствительности ткани к инсулину, можно предположить, что у молодых самок в сытом состоянии чувствительность к инсулину всех исследованных тканей выше, чем у самцов. Соответственно, уровень инсулина, который необходим самкам для поддержания эугликемии в сытом состоянии, ниже, чем таковой у самцов. Таким образом, повышенный по сравнению с самцами уровень экспрессии генов белков трансдукции сигнала инсулина в печени, мышцах и жировой ткани у молодых самок может быть молекулярной основой их большей чувствительности к инсулину в сытом состоянии. В то же время уровень ТГ в крови после ночного голодания у молодых самок был незначительно, но достоверно выше по сравнению с самцами, кроме того, у самок почти на 30 % были повышены уровень инсулина и показатель НОМА-IR ($p = 0.08$, post-hoc Duncan's test). В совокупности эти данные свидетельствуют о сниженной чувствительности к инсулину на фоне голода. Для выяснения молекулярного механизма пониженной чувствительности к инсулину у молодых самок при голодании, по-видимому, необходимо

исследовать влияние голодания на уровень экспрессии генов белков трансдукции сигнала инсулина.

Полученные данные о половых различиях сигнальных путей, определяющих чувствительность к инсулину, в целом хорошо согласуются с данными, имеющимися в литературе. Особенности, связанные с полом, по уровню белков INSR, IRS2 и PI3K и их активности, а также по уровню мРНК соответствующих генов в печени у молодых мышей не изучали. Особенности, связанные с полом, по уровню мРНК генов трансдукции сигнала инсулина в мышечной ткани у молодых животных тоже не изучали, однако показано, что в возрасте 15 недель уровень белка INSR в мышцах у самок и самцов мышей C57BL/6J не различается, тогда как уровни белков IRS1, PI3K и GLUT4 у самок выше, чем у самцов (Shelley et al., 2009; Oh et al., 2011). В жировой ткани у самок мышей C57BL/6 в возрасте 15 недель повышены уровни мРНК *Irs1* и *Slc2a4* (Grove et al., 2010), а также белка GLUT4, по сравнению с самцами (Macotela et al., 2009). Эти данные свидетельствуют о большей чувствительности к инсулину в жировой и мышечной тканях у молодых самок по сравнению с самцами, что совпадает с нашими результатами. При этом, как и в нашем эксперименте, у молодых (13 недель) самок и самцов мышей C57BL/6 толерантность к глюкозе и инсулину не различается (Dakin et al., 2015).

У взрослых животных половые различия по показателям чувствительности к инсулину, согласно нашим данным, усиливались. В сытом состоянии у самок по сравнению с самцами были снижены уровни в крови инсулина и холестерина. Большая чувствительность к инсулину у сытых самок была ассоциирована с повышенными уровнями мРНК *Irs2* и *Pik3cd* в печени, тогда как в мышечной ткани самок по сравнению с самцами были снижены уровни мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4*, а в жировой – уровни мРНК *Insr* и *Pik3cd*. Половые различия по уровню мРНК могут служить молекулярной основой половых различий чувствительности к инсулину: большей чувствительности печени и меньшей – мышц и жировой ткани у взрослых сытых самок по сравнению с самцами. У взрослых самок уровни ТГ и холестерина в крови после ночного голодания были ниже, а толерантность к глюкозе натощак выше, чем у самцов. Поскольку чувствительность к инсулину в печени играет определяющую роль в чувствительности к инсулину целого организма, можно предположить, что у взрослых самок чувствительность к инсулину в печени повышена по сравнению с самцами как в сытом, так и в голодном состоянии. В то же время пониженная чувствительность жировой и мышечной ткани у самок, возможно, объясняет факт отсутствия половых различий по уровню глюкозы в крови у взрослых сытых животных. Согласно данным литературы, влияние пола животного на молекулярный механизм передачи сигнала инсулина у взрослых животных менее изучено. Показано, что в возрасте 24 недель в печени у самок мышей C57BL/6J повышен уровень мРНК *Insr*, а уровень мРНК *Irs1/2* не различается (Spruss et al., 2012). В настоящее время неизвестно, как пол животного влияет на уровень белков INSR, IRS2 и PI3K и их активность в печени у взрослых мышей.

Возрастные изменения чувствительности к инсулину зависели от пола животного: у самок чувствительность к

инсулину в целом повышалась, что подтверждается снижением уровня глюкозы в крови после голодания и повышением толерантности к глюкозе; у самцов — снижалась, о чем свидетельствует повышение уровня холестерина в крови у сытых и уровня ТГ в крови у голодных животных. Снижение чувствительности к инсулину у самцов с возрастом не сопровождалось развитием гипергликемии: уровень глюкозы в крови у сытых животных не отличался от такового у молодых, а после голодания был ниже, чем у молодых, как и у самок. Эти возрастные изменения были ассоциированы у самок с повышением уровня мРНК *Irs2* в печени и со снижением уровней мРНК *Insr* и *Irs1* в мышцах и уровней мРНК *Pik3cd* и *Slc2a4* в жировой ткани. У самцов возрастные изменения чувствительности к инсулину были ассоциированы со снижением уровня мРНК *Insr* в печени и мышечной ткани, тогда как уровень мРНК *Pik3cd* в мышцах и уровни мРНК всех исследованных генов в жировой ткани повышались. Эти изменения могут служить молекулярной основой повышения чувствительности к инсулину в печени и снижения чувствительности к инсулину в мышечной и жировой тканях с возрастом у самок, а также снижения чувствительности к инсулину в печени и мышцах и повышения чувствительности к инсулину в жировой ткани с возрастом у самцов. Следует заметить, что снижение с возрастом уровня мРНК *Insr* в мышцах у самцов, возможно, было компенсировано повышением уровня мРНК *Pik3cd*. По-видимому, чувствительность к инсулину в печени в обоих случаях имеет решающее влияние на чувствительность к инсулину организма в целом. У самок чувствительность печени к инсулину с возрастом увеличивается, соответственно повышается чувствительность в целом, тогда как снижение чувствительности к инсулину в мышечной и жировой тканях, возможно, препятствует снижению с возрастом уровня глюкозы в крови у сытых животных. У самцов, наоборот, чувствительность печени с возрастом снижается, соответственно снижается чувствительность в целом, однако толерантность к глюкозе у самцов с возрастом не меняется, что может быть обусловлено компенсаторным повышением чувствительности к инсулину жировой и мышечной ткани. Кроме того, изменение чувствительности к инсулину в жировой и мышечной тканях, возможно, определяет ослабление с возрастом анаболического действия гормона у самок и усиление такового у самцов, что проявляется в большем увеличении веса тела и относительного веса жировой ткани у самцов.

В литературе имеются данные о влиянии возраста на чувствительность к инсулину у старых животных и пожилых людей (Barzilai et al., 2012; Anisimov et al., 2015; Markofski et al., 2015). В более раннем возрасте зависимость чувствительности к инсулину от возраста изучена только у самок. Показано, что в период с 12 по 24 неделю у самок мышей C57BL/6J после ночного голодания снижается уровень глюкозы, снижается (но не достоверно) показатель НОМА-IR, тогда как уровень инсулина, а также толерантность к инсулину не меняются (Radavelli-Bagatinil et al., 2011), что хорошо согласуется с нашими данными. Особенности молекулярного механизма передачи сигнала инсулина, связанные с возрастом, совершенно не изучены.

Исходя из полученных данных можно предположить, что в основе половых различий чувствительности к инсулину в целом, а также повышения с возрастом толерантности к глюкозе у самок лежит активация транскрипции генов, кодирующих белки трансдукции инсулинового сигнала в печени.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-03187, and State Budgeted Project 0324-2016-0002. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Akoum S.E., Lamontagne V., Cloutier I., Tanguay J.F. Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2011;3:34. DOI 10.1186/1758-5996-3-34.
- Anisimov V.N., Popovich I.G., Zabezhinski M.A., Egormin P.A., Yurova M.N., Semenchenko A.V., Tyndyk M.L., Panchenko A.V., Trashkov A.P., Vasiliev A.G., Khaitsev N.V. Sex differences in aging, life span and spontaneous tumorigenesis in 129/Sv mice neonatally exposed to metformin. *Cell Cycle.* 2015;14(1):46-55. DOI 10.4161/15384101.2014.973308.
- Barzilai N., Huffman D.M., Muzumdar R.H., Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes.* 2012;61(6):1315-1322. DOI 10.2337/db11-1300.
- Copps K.D., White M.F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 2012;55(10):2565-2582. DOI 10.1007/s00125-012-2644-8.
- Dakin R.S., Walker B.R., Seckl J.R., Hadoke P.W., Drake A.J. Estrogens protect male mice from obesity complications and influence glucocorticoid metabolism. *Int. J. Obes. (Lond).* 2015;39(10):1539-1547. DOI 10.1038/ijo.2015.102.
- Ganz M., Csak T., Szabo G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. *World J. Gastroenterol.* 2014;20(26):8525-8534. DOI 10.3748/wjg.v20.i26.8525.
- Grove K.L., Fried S.K., Greenberg A.S., Xiao X.Q., Clegg D.J. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *Int. J. Obes. (Lond).* 2010;34(6):989-1000. DOI 10.1038/ijo.2010.12.
- Hinder L.M., O'Brien P.D., Hayes J.M., Backus C., Solway A.P., Sims-Robinson C., Feldman E.L. Dietary reversal of neuropathy in a murine model of prediabetes and the metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 2017;10:717-725. DOI 10.1242/dmm.028530.
- Macotela Y., Boucher J., Tran T.T., Kahn C.R. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes.* 2009;58(4):803-812. DOI 10.2337/db08-1054.
- Markofski M.M., Dickinson J.M., Drummond M.J., Fry C.S., Fujita S., Gundermann D.M., Glynn E.L., Jennings K., Paddon-Jones D., Reidy P.T., Sheffield-Moore M., Timmerman K.L., Rasmussen B.B., Volpi E. Effect of age on basal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling in a large cohort of young and older men and women. *Exp. Gerontol.* 2015;65:1-7. DOI 10.1016/j.exger.2015.02.015.
- Oh Y.S., Lee T.S., Cheon G.J., Jang I.S., Jun H.S., Park S.C. Modulation of insulin sensitivity and caveolin-1 expression by orchidectomy in a nonobese type 2 diabetes animal model. *Mol. Med.* 2011;17(1-2):4-11. DOI 10.2119/molmed.2009.00105.
- Pettersson U.S., Waldén T.B., Carlsson P.O., Jansson L., Phillipson M. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose

- tissue. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e46057. DOI 10.1371/journal.pone.0046057.
- Radavelli-Bagatini S., Blair A.R., Proietto J., Spritzer P.M., Andrikopoulos S. The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: evaluation of ovarian structure and function. *J. Endocrinol.* 2011;209:307-315. DOI 10.1530/JOE-11-0022.
- Sairam M.R., Wang M., Danilovich N., Javeshghani D., Maysinger D. Early obesity and age-related mimicry of metabolic syndrome in female mice with sex hormonal imbalances. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(7):1142-1154. DOI 10.1038/oby.2006.131.
- Sakamuri A., Pitla S., Putcha U.K., Jayapal S., Pothana S., Vadakkattu S.S., Konapalli N.R., Sakamuri S.S., Ibrahim A. Transient decrease in circulatory testosterone and homocysteine precedes the development of metabolic syndrome features in fructose-fed Sprague Dawley rats. *J. Nutr. Metab.* 2016; Article ID 7510840. DOI 10.1155/2016/7510840.
- Senthil Kumar S.P., Shen M., Spicer E.G., Goudjo-Ako A.J., Stumph J.D., Zhang J., Shi H. Distinct metabolic effects following short-term exposure of different high-fat diets in male and female mice. *Endocr. J.* 2014;61(5):457-470.
- Shelley P., Martin-Gronert M.S., Rowleson A., Poston L., Heales S.J., Hargreaves I.P., McConnell J.M., Ozanne S.E., Fernandez-Twinn D.S. Altered skeletal muscle insulin signaling and mitochondrial complex II-III linked activity in adult offspring of obese mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009;297(3):R675-R681. DOI 10.1152/ajpregu.00146.2009.
- Spruss A., Henkel J., Kanuri G., Blank D., Püschel G.P., Bischoff S.C., Bergheim I. Female mice are more susceptible to nonalcoholic fatty liver disease: sex-specific regulation of the hepatic AMP-activated protein kinase-plasminogen activator inhibitor 1 cascade, but not the hepatic endotoxin response. *Mol. Med.* 2012;18(1):1346-1355. DOI 10.2119/molmed.2012.00223.
- Tripathy D., Carlsson A.L., Lehto M., Isomaa B., Tuomi T., Groop L. Insulin secretion and insulin sensitivity in diabetic subgroups: studies in the prediabetic and diabetic state. *Diabetologia*. 2000;43(12):1476-1483. DOI 10.1007/s0012500515508.



Изменение метаболических показателей и двигательной активности у лабораторных мышей под воздействием микроводорослей (*Chlorella vulgaris*)

Е.Л. Завьялов¹✉, Д.В. Петровский¹, Г.В. Концевая¹, В.В. Мак¹, И.П. Уваров², Я.Л. Завьялова³, О.А. Рожков⁴

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

² Государственное бюджетное учреждение Новосибирской области «Управление ветеринарии города Новосибирска», Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск, Россия

⁴ Государственное бюджетное учреждение Новосибирской области «Управление ветеринарии Новосибирской области», Новосибирск, Россия

В последние годы микроводоросли привлекают все больший интерес как источник потенциальных фармакологически активных соединений. На фоне большого разнообразия микроводорослей выделяется зеленая водоросль хлорелла (*Chlorella vulgaris*), для которой показаны гипотензивные эффекты, антикоагулянтная, антиоксидантная и противоопухолевая активности. Целью настоящей работы было оценить эффекты суспензии хлореллы на массу тела животных, их двигательную активность и эритропоэз. Исследование выполнено на самках и самцах мышей линии ICR. Животным из экспериментальной группы на протяжении трех недель вместо воды предоставляли суспензию хлореллы при стандартной кормовой диете. Масса тела у самцов из контрольной и экспериментальной групп практически не изменялась, тогда как у самок в экспериментальной группе отмечалось увеличение массы тела уже через неделю. Аналогичная ситуация наблюдалась при анализе привеса массы тела животного относительно потребленного корма. В экспериментальной группе количество эритроцитов увеличивалось через три недели после начала исследования как у самок, так и у самцов. Гемоглобин также повышался через три недели после начала эксперимента, но только у самок. Суточная двигательная активность животных всех групп была одинаковой и не изменялась на протяжении исследования. Процедура взятия крови приводила к снижению двигательной активности самцов и самок из контрольной группы и самцов, которые употребляли хлореллу. Двигательная активность самок, которые получали суспензию хлореллы, не изменялась после взятия крови.

Ключевые слова: хлорелла; *Chlorella*; масса тела; двигательная активность; эритроциты; гемоглобин; лабораторные мыши.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Завьялов Е.Л., Петровский Д.В., Концевая Г.В., Мак В.В., Уваров И.П., Завьялова Я.Л., Рожков О.А. Изменение метаболических показателей и двигательной активности у лабораторных мышей под воздействием микроводорослей (*Chlorella vulgaris*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):841-847. DOI 10.18699/VJ17.304

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zavjalov E.L., Petrovskii D.V., Kontsevaya G.V., Mak V.V., Uvarov I.P., Zav'yalova Y.L., Rozhkov O.A. Metabolic and motor activity effects of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in laboratory mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):841-847. DOI 10.18699/VJ17.304 (in Russian)

Metabolic and motor activity effects of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in laboratory mice

E.L. Zavjalov¹✉, D.V. Petrovskii¹, G.V. Kontsevaya¹, V.V. Mak¹, I.P. Uvarov², Y.L. Zav'yalova³, O.A. Rozhkov⁴

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Veterinary control of Novosibirsk, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russia

⁴ Veterinary control of Novosibirsk region, Novosibirsk, Russia

In recent years, the microalgae (*Chlorella vulgaris*) have increasingly attracted great interest as a potential source of pharmacologically active compounds. Showing anticoagulation, antioxidant and antitumor activities of *Chlorella* revealed its hypotensive properties. The aim of this study was to evaluate the effects of *Chlorella* suspension on the weight of the animals, their moving activity, and erythropoiesis. The study was performed on males and females of ICR mice. The animals from the experimental group drank only the *Chlorella* suspension during 3 weeks and were given standard food. Control animals drank during this period only water and had the same food. The body weight of males in the control and the experimental group with *Chlorella* did not change, while females in the experimental group showed an increase of body weight in a week. A similar pattern was obtained for estimation of animal body weight changes relative to food consumption. The number of red blood cells in females and males from group with *Chlorella* increased only after 3 weeks after the start of the experiment. Hemoglobin also increased only after 3 weeks after the start of *Chlorella* consumption, but only for females. All groups of animals had the same motor activity during experiment. Blood sampling resulted in a reduction of activity in control males and females as well as in males with *Chlorella*. The motor activity of females with *Chlorella* after blood sampling did not change. So, consumption of the *Chlorella* suspension by females leads to more effective digestion and resulted in increased body weight, improved erythropoiesis resulted in increased red blood cells and hemoglobin and also increased their resistance to acute stress. The males in the same situation increased only the erythropoiesis.

Key words: *Chlorella*; body weight; motor activity; red blood cells; hemoglobin; laboratory mice.

Received 06.10.2017

Accepted for publication 27.10.2017

© AUTHORS, 2017

В последние годы водоросли привлекают все больший интерес как источник потенциальных фармакологически активных соединений, обладающих противовирусной, антикоагулянтной, антиоксидантной или противоопухолевой активностью (Miyazawa et al., 1988; Guven et al., 1991; Duarte et al., 2001; Trento et al., 2001; Zhang et al., 2003). Многие биологически активные вещества, такие как полисахариды, белки, незаменимые жирные кислоты, бета-каротин и витамины, выделены из морских водорослей (Norziah, Ching, 2000; Aguilera-Morales et al., 2005). Среди всего разнообразия водорослей широкое применение нашли одноклеточные зеленые водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris*), которые живут в пресной воде и встречаются практически повсеместно. Интерес к этим микроводорослям возник еще в середине прошлого века, когда была продемонстрирована их способность продуцировать большое количество относительно дешевого белка (Fowden, 1951, 1952). Высокая биотехнологическая доступность микроводорослей привела к их широкой коммерциализации, в основном в виде пищевых добавок для человека и животных (Oh-Hama, Miyachi, 1988; Iwamoto, 2003; Pulz, Gross, 2004; Khan et al., 2005; Morris et al., 2008). Относительная простота выращивания хлореллы позволила использовать ее в качестве источника не только белка, но и хлорофилла, лютеина и ряда микроэлементов (Jeon et al., 2012; Bueno et al., 2014). Показано, что хлорелла оказывает благотворное воздействие на рост организма, состояние иммунной системы и антиоксидантную активность (Guzmán et al., 2001). В настоящее время зеленые водоросли применяются при лечении гипертензии и модуляции иммунных реакций человека (Merchant, Andre, 2001; Lin et al., 2005; Yang et al., 2006; An et al., 2010). Экстракты хлореллы используются при различных методах терапии опухолей (Tanaka et al., 1998) и бактериальных инфекций (Ibusuki, Minamishima, 1990; Queiroz et al., 2003; Santoyo et al., 2010), продемонстрирована их способность повышать выработку IFN- γ и IL-2, а также активировать клетки Th1 для укрепления иммунной системы и иммунной защиты (An et al., 2008). Показано, что эти водоросли могут затормозить процессы оксидативного стресса, тем самым подавляя выработку провоспалительных медиаторов в макрофагах и печени (Lee et al., 2003). Однако гематологические эффекты хлореллы и ее влияние на поведение животных до сих пор мало изучены.

В настоящее время существует большое разнообразие форм хлореллы, которые используются в качестве пищевых добавок: высушенные порошкообразные микроводоросли, ферментированная хлорелла, экстракты и суспензии. Среди всего разнообразия выделяется высокотемпературный водный экстракт CGF (*chlorella growth factor*), богатый аминокислотами, пептидами, витаминами, минеральными и нуклеиновыми кислотами (Merchant, Andre, 2001). Употребление CGF пациентами на протяжении двух-трех месяцев способствовало снижению кровяного давления и уровня холестерина в крови, а также приводило к ускорению заживления ран у пациентов. Применение высушенной порошкообразной хлореллы, которую добавляли в рацион кур-несушек на протяжении 35 дней, приводило к улучшению качества яиц с повы-

шенным содержанием лютеина в яичных желтках (Jeon et al., 2012; An et al., 2014). Возможности промышленного производства биомассы хлореллы и расширение спектра ее использования выдвигают ряд задач перед микробиологами и биотехнологами в области поиска высокопродуктивных штаммов и оптимизации условий культивирования без потери уникальных свойств этих водорослей. Конечным результатом оценки качества полученного продукта будут эффекты, оказываемые микроводорослями на состояние организма у птиц или млекопитающих. Целью данной работы было исследование эффектов суспензии микроводорослей хлорелла, полученной в фитобиореакторе вихревого типа, на массу тела мышей линии ICR, их двигательную активность, число эритроцитов и уровень гемоглобина в крови.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 16 самцах и 16 самках мышей аутбредной линии ICR в возрасте 6–8 нед. Перед началом эксперимента животных из семейных групп рассаживали индивидуально в стандартные пластиковые клетки с решетчатой металлической крышкой и далее содержали в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) при естественном освещении, комнатной температуре и влажности. Кормили животных сухим гранулированным кормом для лабораторных животных «Чара» (производитель ЗАО «Ассортимент-Агро»). В первые семь дней (неделя «0») всем животным для питья предоставляли водопроводную воду *ad libitum*. Затем половину животных каждого пола на протяжении последующих трех недель продолжали поить водопроводной водой *ad libitum* (контрольная группа). Оставшимся восемью самцам и восемью самкам (экспериментальная группа) на протяжении трех недель (недели «1», «2» и «3») воду заменяли суспензией микроводорослей хлореллы (*C. vulgaris*), которую предоставляли *ad libitum*. Так как сухой остаток биомассы микроводорослей в водной суспензии хлореллы составлял около 0.1 %, воду экспериментальным животным на период проведения исследования не предоставляли. Суспензию хлореллы получали в фитобиореакторе вихревого типа Торнадо на минеральном субстрате, установленном в помещении с комнатной температурой и влажностью. При достижении концентрации микроводорослей в суспензии 12×10^7 Ед/мл содержимое фитобиореактора использовали для поения животных.

Эксперименты на животных выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Оценку общей двигательной активности животного, когда регистрировались любые его движения в клетке (включая все вертикальные и горизонтальные), проводили непрерывно, начиная с 3-го дня эксперимента на протяжении всего периода исследования при помощи авторской системы автоматического мониторинга (Петровский и др., 2012). Основу используемой системы составляли подключенные к персональному компьютеру инфракрасные датчики движения (всего 32), смонтированные над каждой клеткой с животным. Такая конструкция позволяла независимо регистрировать индивидуальные данные от каждого

животного. Фиксировали суммарное время активности животных в секундах за каждые 10 мин наблюдений. Взвешивание животных, корма в кормушке и жидкости в поилке (воды или суспензии хлореллы) проводили один раз в неделю. Привес рассчитывали как изменение массы тела животного по сравнению с предыдущим взвешиванием. Величину потребления корма определяли по разнице значений массы гранулированного корма в кормушке между двумя точками взвешивания. Количество выпитой жидкости (воды или суспензии хлореллы) оценивали по разнице значений массы жидкости между двумя контрольными точками. Дополнительно рассчитывали отношение изменения массы тела животных за контрольный период к потребленному корму как показатель эффективности усвоения корма животным (Рядчиков, 2014). Два раза, через две и три недели после первого предоставления суспензии хлореллы у животных брали образцы крови из ретроорбитального синуса при местной анестезии, после аппликации ватного тампона с новокаином. Содержание эритроцитов и концентрацию гемоглобина определяли в цельной крови на автоматическом ветеринарном гемоанализаторе Hemascreen 18P (Hospitex diagnostics, Италия), согласно инструкции к прибору. Эвтаназию животных после завершения эксперимента осуществляли цервикальной дислокацией. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием многофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Все полученные результаты представлены в виде $\text{Mean} \pm \text{SE}$.

Результаты

Масса тела животных изменялась на протяжении всего эксперимента (рис. 1). Двухфакторный дисперсионный анализ привеса массы тела животных, где факторами служили экспериментальная группа и пол животного, показал достоверное влияние только пола как в конце недели «1», так и недели «2»: $F_{1,31} = 7.14, p = 0.013$ и $F_{1,31} = 18.85, p = 0.002$ соответственно. Влияния фактора принадлежности животных к контрольной или экспериментальной группам в конце недели «1» ($F_{1,31} = 0.84, p = 0.367$ и недели «2» ($F_{1,31} = 0.87, p = 0.359$), а также совместного влияния пола и группы в эти сроки ($F_{1,31} = 1.62, p = 0.215$ и $F_{1,31} = 3.06, p = 0.093$ соответственно) не обнаружено. Через три недели наблюдалась иная картина. Было обнаружено достоверное влияние на массу тела животных как пола ($F_{1,31} = 17.64, p < 0.001$), так и принадлежности животных к контрольной или экспериментальной группам ($F_{1,31} = 4.88, p = 0.037$), но совместного влияния этих факторов не наблюдалось ($F_{1,31} = 0.23, p = 0.633$). Масса тела у самцов из контрольной и экспериментальной групп, а также у самок из контрольной группы практически не изменялась на протяжении исследования, тогда как у самок из экспериментальной группы отмечалось увеличение массы тела уже через неделю (см. рис. 1). В период недель «2» и «3» самки, получавшие хлореллу, имели большие показатели прироста массы тела по сравнению с самками из контрольной группы.

Аналогичная картина была получена при изучении данных привеса массы тела с учетом потребленного животными корма (рис. 2). Двухфакторный дисперсионный анализ этого показателя выявил влияние пола животного

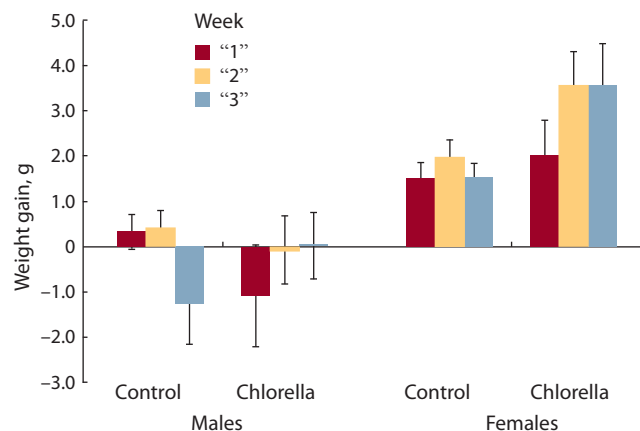


Fig. 1. Weight gain in males and females from the control and experimental groups after week 1, week 2, and week 3 of the experiment.

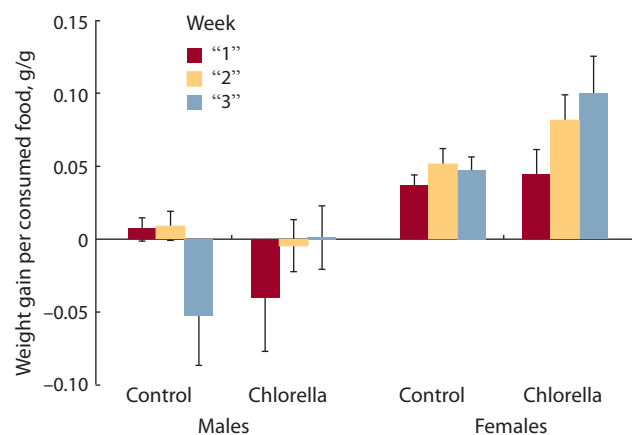


Fig. 2. Weight gain per consumed food in males and females from the control and experimental groups after 1, 2, and 3 weeks of the experiment.

как в конце недели «1» ($F_{1,31} = 10.07, p = 0.004$), так и недели «2» ($F_{1,31} = 20.43, p < 0.001$). Влияния фактора принадлежности животных к контрольной или экспериментальной группам и совместного эффекта факторов группы и пола как для недели «1» ($F_{1,31} = 0.16, p = 0.690$ и $F_{1,31} = 1.66, p = 0.210$ соответственно), так и для недели «2» ($F_{1,31} = 1.49, p = 0.294$ и $F_{1,31} = 2.97, p = 0.098$ соответственно) не обнаружено. Для недели «3» отмечалось достоверное влияние как пола ($F_{1,31} = 18.16, p < 0.001$), так и группы ($F_{1,31} = 4.85, p = 0.035$) на значения этого показателя. Совместного достоверного влияния этих факторов на привес массы тела с учетом потребленного животными корма не наблюдалось ($F_{1,31} = 0.61, p = 0.441$).

Анализ эффектов потребления микроводорослей на содержание эритроцитов в образцах крови показал, что и самцы, и самки демонстрировали повышение значений этого показателя (рис. 3). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние потребления микроводорослей только через три недели ($F_{1,31} = 6.45, p = 0.018$) после начала предоставления хлореллы. Через две недели эффекты потребления хлореллы были на грани достовер-

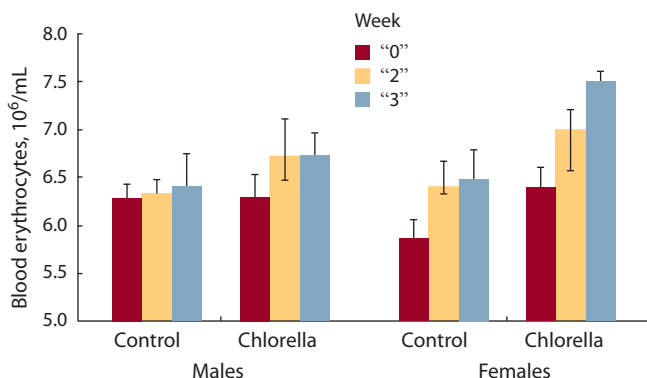


Fig. 3. Erythrocytes in the blood of males and females from the control and experimental groups before the experiment (week 0), at the end of week 2, and at the end of week 3.

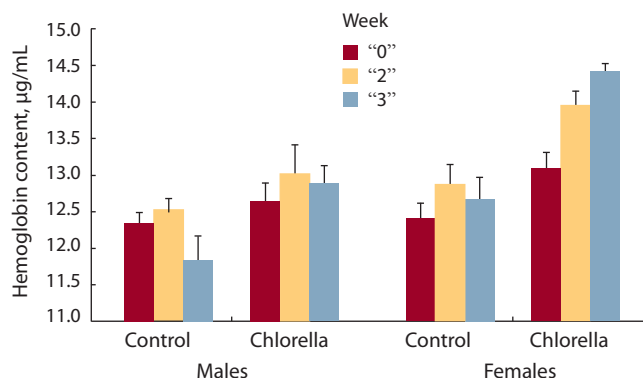


Fig. 4. Blood hemoglobin in males and females from the control and experimental groups before the experiment (week 0), at the end of week 2, and at the end of week 3.

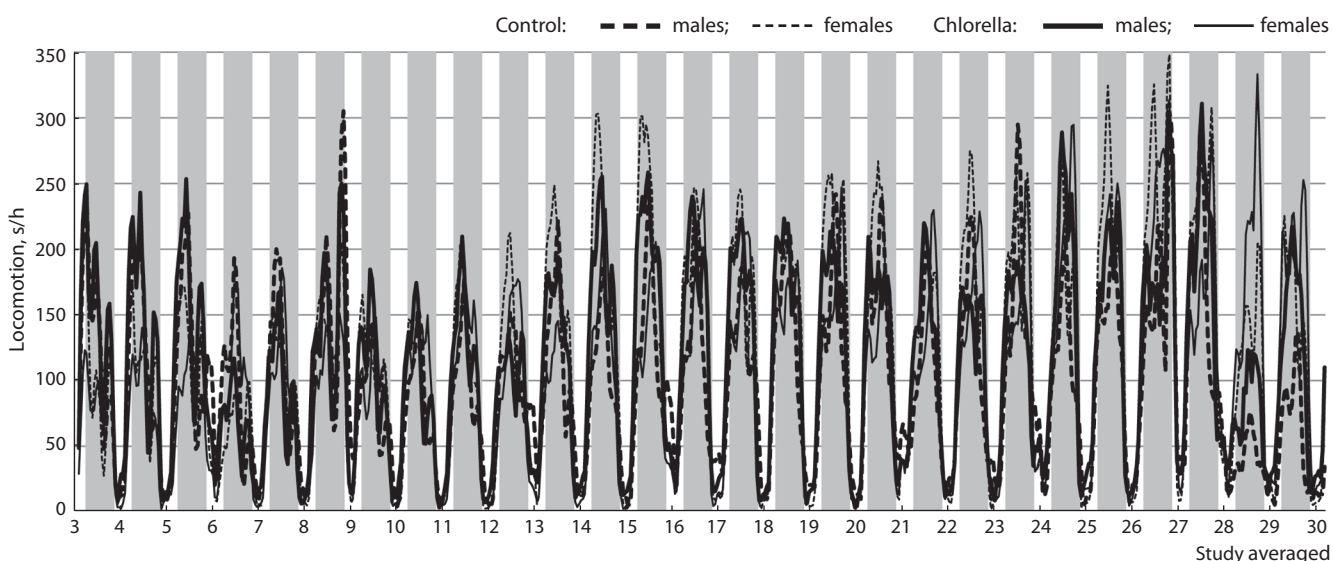


Fig. 5. Locomotor activities of animals in the study averaged over groups. Gray and white stripes are night and day times, respectively.

ности ($F_{1,31} = 3.49, p = 0.074$). Пол животных как для недели «2», так и для недели «3» после начала эксперимента не оказывал влияния на содержание эритроцитов в крови животных ($F_{1,31} = 0.42, p = 0.521$ и $F_{1,31} = 2.55, p = 0.123$ соответственно). Перед началом эксперимента (неделя «0») различий по полу или принадлежности животного к группе в уровне эритроцитов не обнаружено ($F_{1,31} = 0.65, p = 0.429$ и $F_{1,31} = 1.83, p = 0.189$ соответственно).

Уровень гемоглобина в крови исследуемых животных изменялся синхронно с количеством эритроцитов (рис. 4). При двухфакторном дисперсионном анализе в начале эксперимента (неделя «0») не отмечались различия в уровне гемоглобина по полу ($F_{1,31} = 0.57, p = 0.457$), принадлежности животного к группе ($F_{1,31} = 2.22, p = 0.149$) или их совместном действии ($F_{1,31} = 0.34, p = 0.565$). Аналогичная картина наблюдалась через две недели после начала эксперимента. Эффектов пола ($F_{1,31} = 1.55, p = 0.225$), экспериментальной группы ($F_{1,31} = 2.42, p = 0.133$) и их совместного действия ($F_{1,31} = 0.32, p = 0.577$) не обнаружено. Через три недели после начала употребления животными микроводорослей наблюдалось увеличение гемогло-

бина в крови по сравнению с контрольными животными ($F_{1,31} = 8.49, p = 0.008$), причем у самок это увеличение было более выраженным ($F_{1,31} = 5.96, p = 0.022$). Совместного действия пола и экспериментальной группы на показатели гемоглобина не выявлено ($F_{1,31} = 0.53, p = 0.475$).

Самцы и самки из контрольной и экспериментальной групп имели одинаковую высокую двигательную активность в ночное время. В дневные часы активность животных снижалась, достигая практически нулевых значений (рис. 5). На протяжении всего эксперимента ночная активность животных менялась незначительно, кроме нескольких суток после взятия крови.

Исследование поведения животных показало, что животные из экспериментальной группы слабо реагировали на стрессировующую процедуру взятия крови на 28-й день эксперимента (неделя «3») в отличие от животных из контрольной группы в этот же период (рис. 6). Результаты трехфакторного дисперсионного анализа выявили, что двигательная активность животных определялась как принадлежностью к контрольной или экспериментальной группе ($F_{1,31} = 9.73, p = 0.003$), так и полом животных

($F_{1,31} = 13.89$, $p < 0.001$) или продолжительностью воздействия ($F_{1,31} = 7.75$, $p = 0.009$). В первые сутки после взятия крови двигательная активность самцов снижалась, но в экспериментальной группе она была выше (39.13 ± 8.04 %), чем в контрольной (29.12 ± 4.34 %). На вторые сутки двигательная активность самцов увеличивалась как в экспериментальной, так и контрольной группе. Самцы, которым предоставляли хлореллу, были более активны и на вторые сутки по сравнению с контрольными животными: 75.03 ± 12.51 и 39.13 ± 8.04 % соответственно. Самки в меньшей степени реагировали на процедуру взятия крови, чем самцы. Самки, которым предоставляли хлореллу, очень слабо реагировали на процедуру взятия крови. В первые и вторые сутки после взятия крови активность самок мало отличалась от исходного уровня и составляла 94.09 ± 6.28 % и 101.33 ± 7.53 % соответственно. В контрольной группе активность самок снижалась в первые сутки до значений 51.74 ± 7.81 % и на вторые сутки частично восстанавливалась до уровня 72.26 ± 11.82 % от исходной активности (см. рис. 6).

Обсуждение

Благодаря своим уникальным свойствам и доступности, микроводоросли уже нашли широкое применение в сельском хозяйстве (Oh-Hama, Miyachi, 1988; Iwamoto, 2003; Pulz, Gross, 2004; Khan et al., 2005; Morris et al., 2008). Прежде всего, показаны положительные эффекты этих микроорганизмов на увеличение массы тела у сельскохозяйственных животных. Так, например, у свиней отмечалось увеличение массы тела при употреблении хлореллы (Yan et al., 2012). Добавление в рацион бройлеров хлореллы также способствовало увеличению их массы тела по сравнению с контрольными птицами (An et al., 2016; Choi et al., 2016). Аналогичные результаты получены для пекинской утки (Oh et al., 2015). Включение в рацион этих птиц хлореллы на протяжении шести недель не только приводило к заметному увеличению массы, но и сопровождалось повышением качества мяса птиц, в котором отмечалось увеличение содержания каротиноидов, величины pH и способности задерживать воду. Полученные нами высокие показатели роста массы тела мышей, которые употребляли суспензию хлореллы, согласуются с литературными данными. Однако увеличение массы тела при употреблении суспензии хлореллы наблюдалось только у самок мышей через три недели приема микроводорослей. Аналогичная картина наблюдалась и при анализе изменения массы тела животного с учетом потребленного корма. Оказалось, что только самки, употреблявшие хлореллу, более эффективно усваивают корм и набирают массу тела по сравнению с контрольными животными (см. рис. 2). У самцов достоверного увеличения массы тела не наблюдалось. Возможно, это было связано с недостаточно долгим периодом употребления хлореллы животными и низким процентом водорослей в суспензии. Действительно, обнаруженные другими исследователями эффекты хлореллы на массу тела животных получены при употреблении большего количества водорослей более продолжительное время. Например, увеличение массы тела у пекинской утки фиксировалось через шесть недель приема 0.2 % хлореллы (Oh et al., 2015). У свиней наблюдали увеличение массы

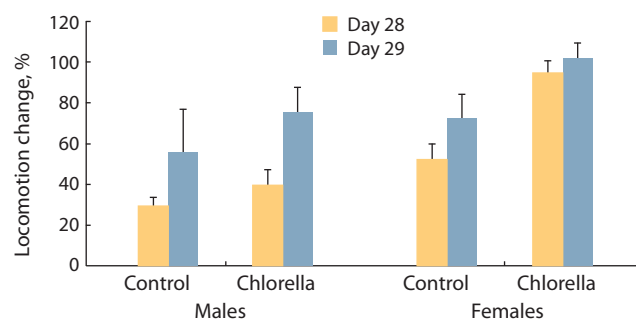


Fig. 6. Daily averaged locomotory activities of animals one day (day 28 of the experiment) and two days (day 29) after blood sampling in comparison with the baseline level of daily activity. The daily activity averaged over the previous three days (days 25, 26, and 27 of the experiment) is taken to be 100 %.

тела после шести недель включения в рацион 0.1 и 0.2 % хлореллы (Yan et al., 2012). Отмеченное увеличение массы тела животных, принимавших хлореллу, возможно, связано с найденными в этих водорослях стимуляторами роста, которые могут влиять на показатели массы тела животных (Han et al., 2002). С другой стороны, в эксперименте на мышах показано, что хлорелла способна защитить животных от иммуносупрессивного действия стресса и связанного с этим образования язвы желудка (Hasegawa et al., 2000). Возможно, протективные свойства хлореллы на состояние желудочно-кишечного тракта также могут реализовываться через повышение эффективности пищеварения в увеличении массы тела животных.

Потребление микроводорослей только у самок мышей приводило к изменению количества эритроцитов и уровня гемоглобина в крови. Но этот эффект отмечался только через три недели потребления хлореллы, когда уровень гемоглобина (см. рис. 4) и содержание эритроцитов (см. рис. 3) достоверно увеличивались. Ранее было показано, что у крыс на фоне анемии присутствие в рационе 5 и 10 % хлореллы через месяц приводило к повышению уровня гемоглобина и эритроцитов в крови, тогда как прием 1 % хлореллы таких эффектов не оказывал (Matsuura et al., 1991). В исследовании эффектов другой микроводоросли, спирулины, прием на протяжении 12 недель у пожилых женщин и мужчин сопровождался подъемом уровня гемоглобина, но количество эритроцитов за этот период увеличивалось только у мужчин. С другой стороны, в литературе имеются данные об отсутствии стимулирующего эффекта микроводорослей на показатели крови у животных. Так, включение в рацион свиней 0.1 и 0.2 % суспензии хлореллы на протяжении шести недель не приводило к изменению уровня эритроцитов, лейкоцитов и лимфоцитов в крови (Yan et al., 2012). Таким образом, эффекты микроводорослей во многом определяются их количеством в рационе и продолжительностью употребления. Отсутствие значимых эффектов употребления хлореллы у самцов может быть связано с недостаточной продолжительностью приема микроводорослей.

Исследование эффектов хлореллы на поведение животных не выявило видимых половых различий. Однако анализ поведения животных после стрессорного воз-

действия, которое отмечается при взятии крови у животного, обнаружил значительные различия между контрольными и экспериментальными животными. Оказалось, что активность самок, употреблявших хлореллу, не изменялась после взятия крови, а активность самцов восстанавливалась уже на вторые сутки после воздействия (см. рис. 6). Несмотря на многочисленные исследования, в которых были показаны антиоксидантные и противовоспалительные свойства хлореллы, противоопухолевые или другие положительные эффекты на организмы животных или человека (Vijayavel et al., 2007; Wang et al., 2010; Panahi et al., 2012a, b, 2013; Kim et al., 2015; Kubatka et al., 2015), работы по влиянию микроводорослей на поведение практически отсутствуют. Тем не менее при исследовании эффектов хлореллы, которую использовали как дополнение к стандартной схеме терапии антидепрессантами пациентов с диагнозом Большое депрессивное расстройство (БДР), характеризующееся в том числе утратой интересов, снижением энергичности и повышенной утомляемостью, была показана ее эффективность (Panahi et al., 2015). У пациентов, принимавших антидепрессанты на фоне употребления хлореллы, отмечалось более значительное улучшение физического состояния и когнитивных способностей по сравнению с группой, где для лечения использовали только антидепрессанты. Известно, что длительное негативное стрессирующее воздействие сопровождается угнетением многих функций организма, приводит также к снижению физической активности и развитию депрессивного состояния (Slavich, Irwin, 2014). Полученные нами данные о более эффективном восстановлении активности животных, употреблявших хлореллу, в ответ на стрессирующее воздействие согласуются с результатами, выявленными при изучении эффектов хлореллы в терапии БДР (Panahi et al., 2015), и свидетельствуют о потенцирующем влиянии хлореллы на активность животных. Аналогичные результаты получены при исследовании стрессирующих эффектов принудительного плавания на выносливость мышей (Mizoguchi et al., 2011). Показано, что самцы мышей линии BALB/c, употреблявшие хлореллу в концентрации 0.5 %, обладали большей выносливостью и плавали дольше, чем животные из контрольной группы.

Таким образом, употребление суспензии хлореллы приводит у самок к более эффективному усвоению корма и, как следствие, к увеличению их массы тела, улучшает эритропоэз и увеличивает содержание гемоглобина в эритроцитах через три недели употребления микроводорослей, а также повышает их устойчивость к воздействию острого стресса. У самцов употребление хлореллы приводит только к увеличению эритроцитов в крови.

Acknowledgments

The purchase of laboratory animals was supported by State Budgeted Project 0324-2017-0004 (Bioresource Collections). Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aguilera-Morales M., Casas-Valdez M., Carrillo-Domínguez S., González-Acosta B., Pérez-Gil F. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. *J. Food Comp. Anal.* 2005;18(1):79-88.
- An B.K., Jeon J.Y., Kang C.W., Kim J.M., Hwang J.K. The tissue distribution of lutein in laying hens fed lutein-fortified chlorella and production of chicken eggs enriched with lutein. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 2014;34:172-177.
- An B.K., Kim K.-E., Jeon J.Y., Lee K.W. Effect of dried *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* growth factor on growth performance, meat qualities and humoral immune responses in broiler chickens. *Springerplus.* 2016;5(1):718-725. DOI 10.1186/s40064-016-2373-4.
- An H.J., Rim H.K., Jeong H.J., Hong S.H., Um J.Y., Kim H.M. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* improve immune function in protein-deficient weanling mice and immune cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2010;32(4):585-592.
- An H.J., Rim H.K., Lee J.H., Hong J.W., Kim N.H., Myung N.Y., Moon P.D., Choi I.Y., Na H.J., Jeong H.J., Park H.S., Han J.G., Um J.Y., Kim H.M. Effect of *Chlorella vulgaris* on immune-enhancement and cytokine production *in vivo* and *in vitro*. *Food Sci. Biotechnol.* 2008;17(5):953-958.
- Buono S., Langellotti A.L., Martello A., Rinna F., Fogliano V. Functional ingredients from microalgae. *Food Funct.* 2014;5:1669-1685. DOI 10.1039/C4FO00125G.
- Choi H., Jung S.K., Kim J.S., Kim K.W., Oh K.B., Lee P.Y., Byun S.J. Effects of dietary recombinant chlorella supplementation on growth performance, meat quality, blood characteristics, excreta microflora, and nutrient digestibility in broilers. *Poult. Sci.* 2016;pew345. DOI 10.3382/ps/pew345.
- Duarte M.E., Nosedá D.G., Nosedá M.D., Tulio S., Pujol C.A., Damonte E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. *Phytomedicine.* 2001;8(1):53-58.
- Fowden L. The quantitative recovery and colorimetric estimation of amino-acids separated by paper chromatography. *Biochem J.* 1951;48(3):327-333.
- Fowden L. The composition of the bulk proteins of *Chlorella*. *Biochem. J.* 1952;50(3):355-358.
- Guzmán S., Gato A., Calleja J.M. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother. Res.* 2001;15:224-230. DOI 10.1002/ptr.715.
- Güven K.C., Özsoy Y., Ulutin O.N. Anticoagulant, fibrinolytic and antiagregant activity of carrageenans and alginic acid. *Bot. Mar.* 1991;34(5):429-432.
- Han J.G., Kang G.G., Kim J.K., Kim S.H. The present status and future of *Chlorella*. *Food Sci. Ind.* 2002;6:64-69.
- Hasegawa T., Noda K., Kumamoto S., Ando Y., Yamada A., Yoshikai Y. *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-induced apoptosis in thymocytes of mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 2000;22(11):877-885.
- Ibusuki K., Minamishima Y. Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 1990;9(2):121-128.
- Iwamoto H. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species – *Chlorella*. Ed. A. Richmond. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.* Oxford: Blackwell Science, 2004;255-263.
- Jeon J.Y., Kim K.E., Im H.J., Oh S.T., Lim S.U. The production of lutein-enriched eggs with dietary *Chlorella*. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 2012;32:13-17.
- Khan Z., Bhadouria P., Bisen P.S. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2005;6:373-379. DOI 10.2174/138920105774370607.
- Kim W., Lee W.-B., Lee J.-W., Min B.-I., Baek S.K., Lee H.S., Cho S.-H. Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review. *Compl. Ther. Med.* 2015;23(4):626-632.

- Kubatka P., Kapinová A., Kružliak P., Kello M., Výbohová D., Kajo K., Novák M., Chripková M., Adamkov M., Pěč M., Mojžiš J., Bojková B., Kassayová M., Stollárová N., Dobrota D. Antineoplastic effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the breast cancer model. *Nutrition*. 2015;31(4):560-569. DOI 10.1016/j.nut.2014.08.010.
- Lee H.S., Choi C.Y., Cho C., Song Y. Attenuating effect of chlorella supplementation on oxidative stress and NFκB activation in peritoneal macrophages and liver of C57BL/6 mice fed on an atherogenic diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003;67(10):2083-2090.
- Lin Y.L., Liang Y.C., Lee S.S., Chiang B.L. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-κB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Leukoc. Biol.* 2005;78(2):533-543.
- Merchant R.E., Andre C.A. A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. *Altern. Ther. Health Med.* 2001;7(3):79-91.
- Miyazawa Y., Murayama T., Ooya N., Wang L.F., Tung Y.C., Yamaguchi N. Immunomodulation by a unicellular green algae (*Chlorella pyrenoidosa*) in tumor-bearing mice. *J. Ethnopharmacol.* 1988;24(2-3):135-146.
- Mizoguchi T., Arakawa Y., Kobayashi M., Fujishima M. Influence of *Chlorella* powder intake during swimming stress in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011;404:121-126.
- Morris H.J., Almarales A., Carrillo O., Bermúdez R.C. Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresour. Technol.* 2008;99:7723-7729.
- Norziah M.H., Ching C.Y. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chem.* 2000;68(1):69-76.
- Oh S.T., Zheng L., Kwon H.J., Choo Y.K., Lee K.W., Kang C.W., An B.K. Effects of dietary fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on growth performance, relative organ weights, cecal microflora, tibia bone characteristics, and meat qualities in Pekin ducks. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2015;28(1):95-101. DOI 10.5713/ajas.14.0473.
- Oh-Hama T., Miyachi S. *Chlorella*. Eds. M.A. Borowitzka, L.J. Borowitzka. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988;3-26.
- Queiroz M.L.S., Rodrigues A.P.O., Bincoletto C., Figueirêdo C.A.V., Malacrida S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int. Immunopharmacol.* 2003;3(6):889-900.
- Panahi Y., Badeli R., Karami G.R., Badeli Z., Sahebkar A. A randomized controlled trial of 6-week *Chlorella vulgaris* supplementation in patients with major depressive disorder. *Complement. Ther. Med.* 2015;23(4):598-602. DOI 10.1016/j.ctim.2015.06.010.
- Panahi Y., Ghamarchehreh M.E., Beiraghdar F., Zare M., Jalalian H.R., Sahebkar A. Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. *Hepatogastroenterology*. 2012a;59:2099-2103.
- Panahi Y., Mostafazadeh B., Abrishami A., Saadat A., Beiraghdar F., Taviana S., Pishgoo B., Parvin S., Sahebkar A. Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* supplementation on the modulation of oxidative stress in apparently healthy smokers. *Clin. Lab.* 2013;59:579-587.
- Panahi Y., Taviana S., Sahebkar A., Masoudi H., Madanchi N. Impact of adjunctive therapy with *Chlorella vulgaris* extract on antioxidant status, pulmonary function, and clinical symptoms of patients with obstructive pulmonary diseases. *Sci. Pharm.* 2012b;80:719-730.
- Petrovskii D.V., Mak V.V., Romashchenko A.V., Kontsevaya G.V., Kolesova I.E., Lomovsky O.I., Odonmazhig P., Amgalan Zh., Moshkin M.P. The influence of nanobiocomposite obtained by mechanochemical synthesis from barren parts of sea-buckthorn on seasonal adaptive rearrangements in Djungarian hamsters. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2012;4:449-456. (in Russian)
- Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004;65:635-648.
- Ryadchikov V.G. *Osnovy pitaniya i kormleniya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh [Fundamentals of Nutrition and Feeding of Farm Animals]*. Krasnodar, 2014. (in Russian)
- Tanaka K., Yamada A., Noda K., Hasegawa T., Okuda K., Shoyama Y., Nomoto K. A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK22 shows antimetastatic immunopotentiality. *Cancer Immunol. Immunother.* 1998;45(6):313-320.
- Trento F., Cattaneo F., Pescador R., Porta R., Ferro L. Antithrombin activity of an algal polysaccharide. *Thromb. Res.* 2001;102(5):457-465.
- Santoyo S., Plaza M., Jaime L., Ibañez E., Reglero G., Señorans F.J. Pressurized liquid extraction as an alternative process to obtain antiviral agents from the edible microalga *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58(15):8522-8527.
- Slavich G.M., Irwin M.R. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychol. Bull.* 2014;140(3):774-815. DOI 10.1037/a0035302.
- Vijayavel K., Anbuselvam C., Balasubramanian M.P. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Mol. Cell Biochem.* 2007;303:39-44.
- Wang H.M., Pan J.L., Chen C.Y., Chiu C.C., Yang M.H., Chang H.W., Chang J.S. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochem.* 2010;45:1865-1872.
- Yan L., Lim S.U., Kim I.H. Effect of fermented chlorella supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbial and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2012;25(12):1742-1747. DOI 10.5713/ajas.2012.12352.
- Yang F., Shi Y., Sheng J., Hu Q. In vivo immunomodulatory activity of polysaccharides derived from *Chlorella pyrenoidosa*. *Eur. Food Res. Technol.* 2006;224(2):225-228.
- Zhang Q., Li N., Zhou G., Lu X., Xu Z., Li Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol. Res.* 2003;48(2):151-155.

Эффективность ольфакторного транспорта аморфных и кристаллических наночастиц оксидов марганца

А.В. Ромашенко^{1,2}✉, Д.В. Петровский¹, М.Б. Шарапова¹, Ю.М. Мошкин¹, К.Э. Купер³, К.Н. Морозова¹, Е.В. Киселева¹, М.П. Мошкин¹

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

² Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Известно, что наноразмерные твердые аэрозоли способны поступать из носовой полости в мозг в обход гематоэнцефалического барьера. Необходимость исследования факторов, влияющих на назальный транспорт наночастиц, обусловлена тем, что таким образом в мозг могут проникать как ксенобиотики, так и терапевтические препараты. Показано, что биодоступность твердых частиц определяет их размер и поверхностный заряд. Вместе с тем влияние структуры кристаллической решетки практически не исследовано. В данной работе, выполненной на половозрелых самцах мышей C57BL/6J, проанализирована эффективность поступления в ольфакторный эпителий (ОЭ) и обонятельные луковицы (ОЛ) интраназально апплицированных наночастиц оксидов марганца с аморфной и кристаллической структурой. Для оценки накопления магнито-контрастных наночастиц марганца в ОЛ и ОЭ использовали T1-взвешенную магнитно-резонансную томографию. Установлено, что аморфные частицы накапливаются в ОЭ и ОЛ в большей степени, чем кристаллические. Одной из причин различного поступления в головной мозг интраназально введенных нанообъектов может быть неодинаковая способность аморфных и кристаллических частиц преодолевать мукозальный слой, покрывающий ОЭ. Действительно, введение муколитика (дитиотреитол) за 20 мин до аппликации не увеличивало накопление в ОЭ и ОЛ аморфных частиц, но повышало эффективность поступления кристаллических наночастиц. Сведения о различном поступлении аморфных и кристаллических наночастиц из носовой полости в мозг, а также обоснование ключевой роли мукозального слоя в дифференцировании проникающей способности этих частиц будут полезны и при разработке подходов к оценке токсикологической опасности воздушной среды, и для оптимизации методов ингаляционной терапии.

Ключевые слова: аморфные и кристаллические наночастицы; ольфакторный транспорт; мукозальный слой; магнитно-резонансная томография.

Olfactory transport efficiency of the amorphous and crystalline manganese oxide nanoparticles

A.V. Romashchenko^{1,2}✉, D.V. Petrovskii¹, M.B. Sharapova¹, Y.M. Moshkin¹, K.E. Kuper³, K.N. Morozova¹, E.V. Kiseleva¹, M.P. Moshkin¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² The Institute of Computational Technologies SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The ability to deliver particulated xenobiotics and therapeutic drugs directly from the nasal cavity to the central nervous system, bypassing the hemato-encephalic barrier, determines a high importance of investigation of factors influencing this process. It was shown that the bioavailability of solid particles is influenced by their size and surface charge. At the same time, the impact of a crystal structure (crystalline/amorphous) has been poorly investigated. In this study, using sexually mature male C57BL/6J mice, we analyzed the efficiency of the nose-to-brain transport of crystalline and amorphous manganese oxide nanoparticles. T1-weighted magnetic resonance imaging (MRI) was used to evaluate the accumulation of manganese nanoparticles in olfactory bulb (OB) and olfactory epithelium (OE). So, it has been established that amorphous particles have higher accumulation rate in OE and OB in comparison with crystalline particles after their intranasal administration. The unequal ability of amorphous and crystalline particles to overcome the mucosal layer covering the OE may be one of the possible reasons for the different nose-to-brain transport efficiency of particulated matter. Indeed, the introduction of mucolytic (dithiothreitol) 20 minutes prior to intranasal particle application did not influence the accumulation of amorphous particles in OE and OB, but enhanced the efficiency of crystalline nanoparticle entry. Data on the different intake of amorphous and crystalline nanoparticles from the nasal cavity to the brain, as well as the evidence for the key role of the mucosal layer in differentiating the penetrating power of these particles will be useful in developing approaches to assessing air pollution and optimizing the methods of inhalation therapy.

Key words: amorphous and crystalline nanoparticles; olfactory transport; mucosal layer; magnetic resonance imaging.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ромашенко А.В., Петровский Д.В., Шарапова М.Б., Мошкин Ю.М., Купер К.Э., Морозова К.Н., Киселева Е.В., Мошкин М.П. Эффективность ольфакторного транспорта аморфных и кристаллических наночастиц оксидов марганца. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(7):848-855. DOI 10.18699/VJ17.305

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Romashchenko A.V., Petrovskii D.V., Sharapova M.B., Moshkin Y.M., Kuper K.E., Morozova K.N., Kiseleva E.V., Moshkin M.P. Olfactory transport efficiency of the amorphous and crystalline manganese oxide nanoparticles. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):848-855. DOI 10.18699/VJ17.305 (in Russian)

Образование твердых наноразмерных аэрозолей происходит в результате как естественных процессов (лесные пожары, извержения вулканов и пылевые бури), так и действия антропогенных факторов (добыча полезных ископаемых, сжигание топлива в двигателях, электростанциях и т. д.) (Borm, 2002; Kittelson et al., 2004; Barman et al., 2009). Таким образом, субмикронные и наноразмерные аэрозоли присутствовали в атмосфере задолго до нанотехнологического бума и продолжают представлять серьезную проблему для здоровья людей. Основной вектор современных исследований токсических эффектов наночастиц и наноаэрозолей направлен на изучение их поражающего воздействия на респираторную и сердечно-сосудистую системы (Donaldson et al., 2002; Chen et al., 2008; Brook et al., 2010; Kampfrath et al., 2011). При этом респираторная система рассматривается в качестве одной из основных порталов систем для поступления наночастиц в организм. Однако, помимо очевидного воздействия наноаэрозолей на респираторную и сердечно-сосудистую системы, частицы могут захватываться ольфакторным эпителием носовой полости и проникать в центральную нервную систему (ЦНС) в обход гемато-энцефалического барьера, где способны ускорять развитие нейродегенеративных заболеваний (Genter et al., 2012; Heusinkveld et al., 2016; Parmalee, Aschner, 2016; Patchin et al., 2016). Нейропатологии, возникающие в результате воздействия на организм наноаэрозолей, трудно исследовать вследствие отсроченного характера их возникновения. Тем не менее при сопоставлении результатов эпидемиологических исследований на людях, а также данных экспериментов на мышах можно предположить, что наночастицы вносят значительный вклад в эти процессы (Wu et al., 2011; Sharma et al., 2012; Trickler et al., 2012; Iqbal et al., 2013). Эпидемиологические наблюдения, в том числе вошедшие в отчеты Всемирной организации здравоохранения, указывают на то, что субмикронные и наноразмерные аэрозоли являются существенными факторами риска для болезней, обусловленных нарушением центральных механизмов регуляции, в том числе и нейродегенеративных патологий. Иными словами, мозг – одна из значимых мишеней для токсического действия наночастиц, присутствующих в воздушной среде. Причем, как показывают последние исследования, накопление в мозге вдыхаемых наночастиц определяется на 80 % их поступлением из носовой полости и только на 20 % – из легких (Kreyling, 2016).

Нейрональный захват (ольфакторные нейроны, нейроны тройничного нерва) и их последующий аксональный транссинаптический транспорт в более глубокие структуры мозга – наиболее вероятный путь проникновения твердых частиц из носовой полости в мозг (Elder et al., 2006; Genter et al., 2012; Patchin et al., 2016). Участие клеточного транспорта в перемещении твердых частиц из носовой полости в мозг впервые показано на примере нейротропных вирусов. Их проникновение подавляется введением ингибиторов аксонального транспорта или веществ, индуцирующих апоптоз ольфакторных нейронов (Stroop et al., 1984; Morales et al., 1988; Ryzhikov et al., 1995). Одним из важнейших факторов, определяющим эффективность захвата наноразмерных объектов ольфакторным эпителием (ОЭ) при их интраназальной

аппликации, является диффузия частиц сквозь слой слизи, в который погружены окончания обонятельных нейронов (Lai et al., 2007; Crater, Carrier, 2010). Мукозальный матрикс представляет собой вязкоупругий гель, состоящий из высокомолекулярных гликопротеинов, с одной стороны, формирующий первый химический барьер на пути проникновения в организм патогенов и ксенобиотиков, с другой, снижающий эффективность доставки лекарственных средств на основе частиц за счет пространственных и/или адгезионных взаимодействий. Поэтому исследование факторов, влияющих на процесс диффузии наноразмерных объектов сквозь мукозальный слой, имеет важное как эпидемиологическое, так и терапевтическое значение.

На эффективность проникновения наночастиц сквозь мукозальный слой влияют такие их свойства, как размер, гидрофильность и, в меньшей степени, дзета-потенциал (Lai et al., 2009). Влияние структуры кристаллической решетки на этот процесс практически не исследовано. При этом для ряда слаборастворимых фармпрепаратов показана большая биодоступность аморфных форм по сравнению с кристаллическими (Yang et al., 2010).

В решении этой задачи большое значение имеет подбор модельных нанообъектов, обладающих различными структурными характеристиками (кристаллические или аморфные), в том числе размерами и дзета-потенциалом, а также доступными для прижизненной визуализации методами биомиджинга. Всем эти требованиям отвечают нерастворимые магнитоконтрастные частицы оксидов марганца. Марганец способен значительно сокращать время спин-решетчатой релаксации протонов, что позволяет довольно точно определить места его локализации при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ). Ранее нами было показано, что через 12 ч после однократного интраназального введения мышам наночастиц оксида марганца ($MnO \cdot nH_2O$) наблюдалось значительное увеличение уровня МРТ-сигнала в ОЭ и обонятельных луковицах (ОЛ) животных, обусловленное накоплением Mn. Причем интенсивность МРТ-сигнала высокодостоверно коррелировала с содержанием марганца в тканях мозга, которое было измерено методом атомно-эмиссионной спектроскопии (Moshkin et al., 2014). В данном исследовании, используя T1-взвешенную МРТ *in vivo*, мы сравнили проникновение аморфных наночастиц ($Mn_3O_4 \cdot nH_2O$ аморф.) и частиц с выраженной кристаллической структурой ($Mn_3O_4 \cdot nH_2O$ кристал.) через мукозальный слой и их последующее накопление в ОЭ мыши при однократном интраназальном введении. Для оценки влияния параметров мукозального геля на эффективность проникновения частиц в ОЭ предварительно перед введением коллоида носовую полость обрабатывали раствором муколитика (дитиотреитол), снижающего вязкость продуцируемой слизи.

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Эксперименты поставлены на самцах мышей SPF-статуса инбредной линии C57BL/6J в возрасте 12–14 нед (28–32 г). После отсадки в трехнедельном возрасте и до исследований животных содержали группами по пять особей одного пола в стандартных

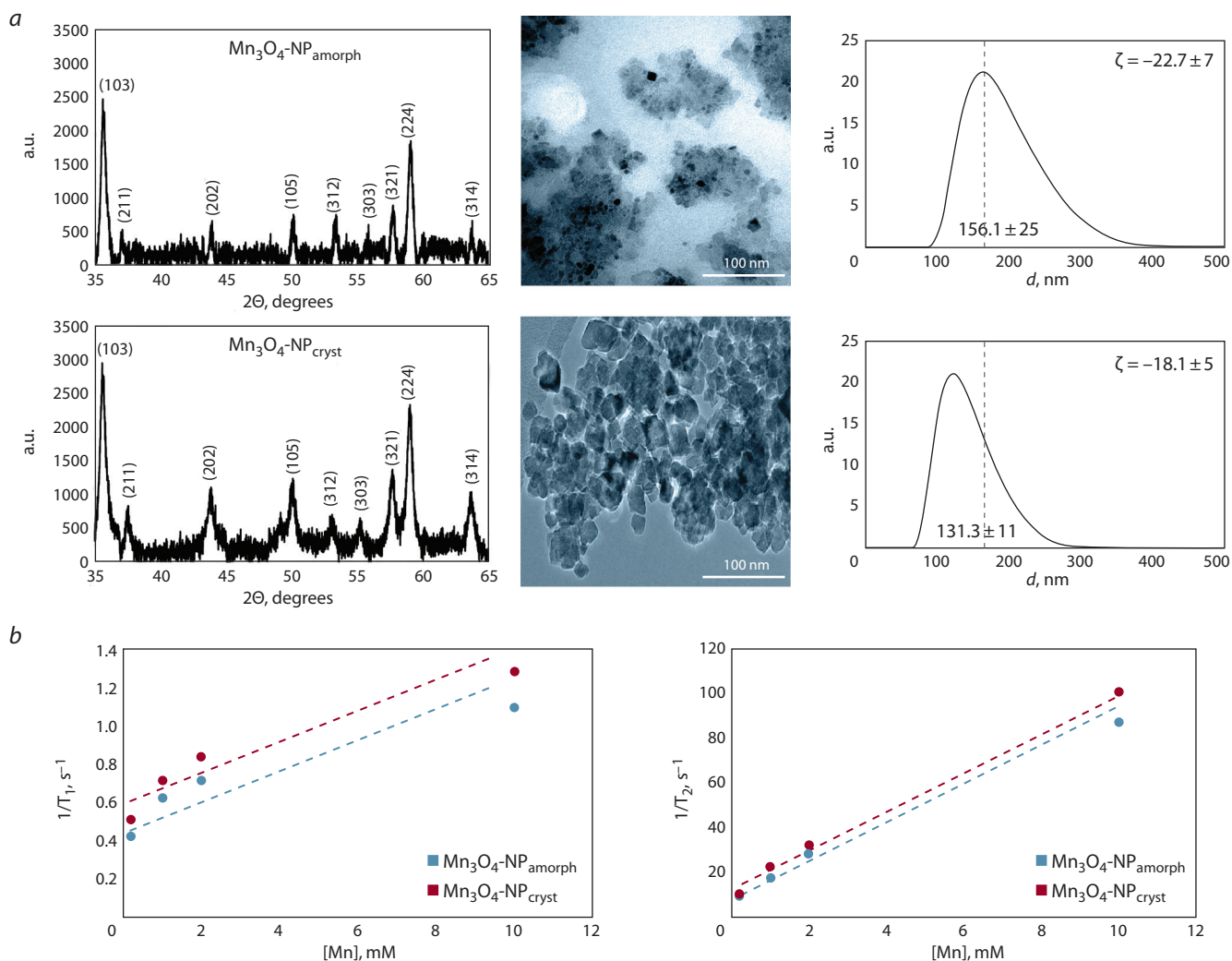


Fig. 1. Physicochemical characterization of amorphous and crystalline Mn_3O_4 nanoparticles.

(a) Crystal lattice parameters (left), morphology (center), and size (right). Upper row, amorphous particles; lower row, crystalline particles. Characterization of the crystalline phase in a Mn_3O_4 -NP sample by powder diffraction at the synchrotron radiation facility, Institute of Nuclear Physics, Novosibirsk. Colloid photographs were taken by high-resolution TEM. Parameters: hydrodynamic radii (d) and ζ potentials of Mn_3O_4 -NP_{amorph} and Mn_3O_4 -NP_{cryst} (b) Dependence of reciprocal relaxation times T_1 and T_2 on manganese concentrations in Mn_3O_4 -NP_{amorph} and Mn_3O_4 -NP_{cryst} samples.

клетках ($35 \times 25 \times 12$ см) при температуре $22-24$ °C и искусственном световом режиме 14C:10T. Брикетированный корм («Чара», Павловский Посад) и воду мыши получали *ad libitum*. В качестве подстилочного материала применяли обеспыленные древесные опилки.

Наночастицы. В работе использовано два типа наночастиц (НЧ) оксида марганца – коммерчески доступные кристаллические наночастицы Mn_3O_4 (Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.}, US3340, US-NANO, США), а также полученные в результате гидролиза хлорида марганца (II) наночастицы Mn_3O_4 (Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.}).

Для получения Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} к 0.5 мл 0.2 М раствора $MnCl_2$, содержащего в качестве кэпирующего агента 12 % Tween 20, добавляли 0.5 мл 0.4 М раствора KOH, содержащего 16 % Tween 20, после чего активно перемешивали с помощью вортекса в течение 30 с. Далее полученные частицы отмывали, для чего их осаждали центрифугированием при 18000 G в течение 15 мин. Все

операции проводили при комнатной температуре. После удаления надосадочной жидкости к осадку частиц добавляли деионизированную воду в объеме, равном объему исходного раствора, и соницировали в течение 1 ч при температуре 4 °C на ультразвуковом гомогенизаторе QSonica Q700 с непогружным зондом Cup Horn (5.5» cup) (QSonica, США) (110 В, 50/60 Гц, частота 20 кГц, мощность 300 Вт/л; число циклов ON/OFF (30 с/30 с) – 60). Процедуру отмывки проводили четыре раза, после чего получали стабильный коллоидный раствор.

Характеристика использованных наночастиц. Физико-химические характеристики использованных частиц представлены на рис. 1, а.

Морфологию и размеры наночастиц изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Микроскоп – JEM 1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой Veleta (SIS, Германия). Характеристику кристаллической решетки использованных в работе наночастиц

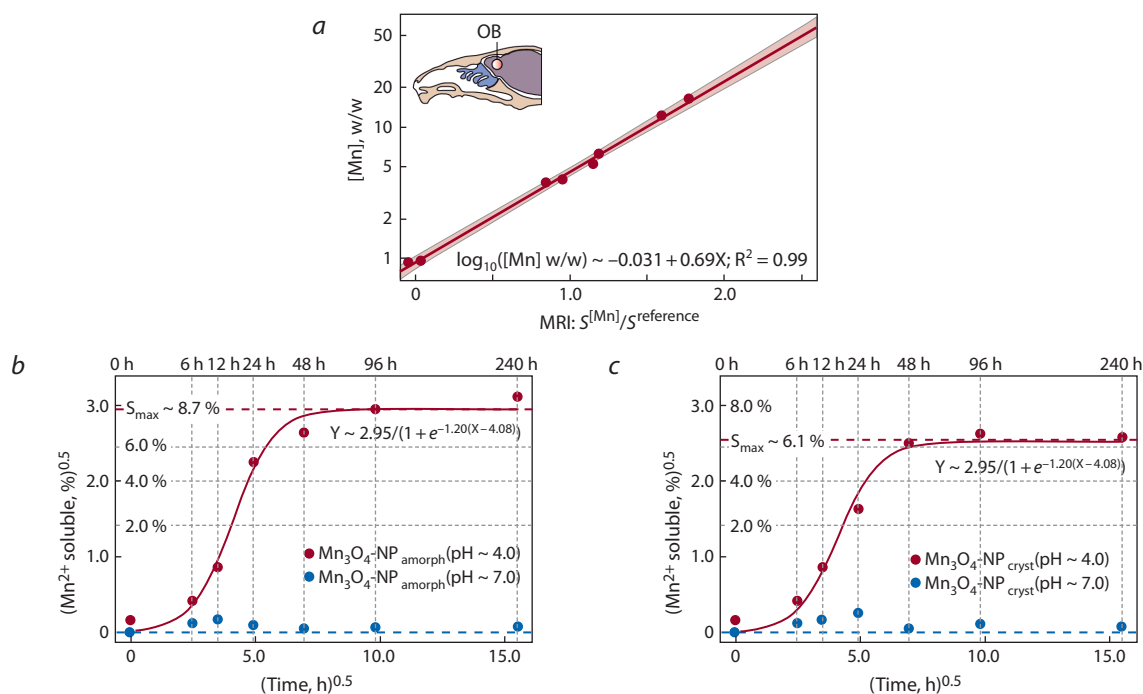


Fig. 2. The potential of $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-NP}_{\text{amorph}}$ and $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-NP}_{\text{cryst}}$ as contrasts and their solubility in biologic media.

(a) Correlation between the MRI signal amplitude in mouse olfactory bulbs (OBs) in T1-weighted images and manganese concentrations in OB tissue 24 h after intranasal $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-NP}_{\text{cryst}}$ application. The accumulation of nanoparticles in tissues was assessed from MRI responses in T1-weighted images normalized to the reference. Manganese concentrations in tissues were measured by atomic emission spectroscopy with two-jet arc plasma. (b, c) Dynamics of the dissolution of (b) $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-NP}_{\text{amorph}}$ and (c) $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-NP}_{\text{cryst}}$ at pH 6.8 (citrate buffer) and pH 4.0 (citrate buffer) within 10 days.

($\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}_{\text{аморф}}$, $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}_{\text{кристал}}$) проводили с помощью порошковой дифрактометрии на станции синхротронного излучения (ИЯФ СО РАН) (Evdokov et al., 2009) (см. рис. 1, а).

Параметры наночастиц в суспензии определяли методом динамического светорассеяния при углах рассеяния 90° и температуре 22°C и электрофореза с помощью Zeta-sizer NanoZS (Malvern, Великобритания) в соответствии с протоколом производителя (см. рис. 1, а).

Марганец является парамагнетиком, поэтому способен сокращать время спин-решетчатой релаксации (T_1) при проведении МРТ. Для всех наночастиц были получены характеристические времена релаксации на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл. Обратные величины релаксации (T_1^{-1} , мс^{-1} и T_2^{-1} , мс^{-1}) находились в прямо пропорциональной зависимости от концентрации марганца в образцах (см. рис. 1, б). Далее в экспериментах *in vivo* было показано, что уровень МРТ-сигнала в ОЛ через 12 ч после интраназальной аппликации $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}_{\text{кристал}}$ прямо пропорционален концентрации марганца в образце (рис. 2, а).

Это дало нам возможность перейти к количественным оценкам эффективности захвата и транспорта магнито-контрастных наночастиц из носовой полости в мозг. Используя данный подход, мы определили, что концентрация $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$ в обонятельных луковицах мыши достигает максимума через сутки после их однократного интраназального введения. Для того чтобы оценить вклад в наблюдаемые эффекты возможного частичного растворения кристаллических и аморфных $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$, проведена оцен-

ка растворимости используемых частиц при различных pH в биологических средах. Измерение растворимости проводили, основываясь на том, что релаксивность ионов марганца примерно в 50 раз выше релаксивности используемых частиц, поэтому при растворении частиц резко возрастает релаксивность раствора, что позволяет определить концентрацию ионов в растворе. Зная начальное содержание марганца в пробе в виде нерастворимых частиц и количество ионов марганца в растворе, возможно оценить динамику растворения наночастиц (см. рис. 2, б, в).

Для интраназального введения использовали коллоидные растворы наночастиц с концентрацией марганца 5.5 г/л. За 1 ч до введения растворы наночастиц диспергировали на ультразвуковом гомогенизаторе при частоте 20 кГц, мощности 300 Вт. Образец подвергали сонификации в течение 30 одномоментных циклов (30 с ON и 30 с OFF) и далее определяли параметры с помощью динамического углового светорассеяния (см. рис. 1, а).

Схема экспериментов. При исследовании накопления различных наночастиц марганца в ОЭ и ОЛ ненаркотизированным животным (для каждого типа наночастиц $n = 6$) вводили по 10 мкл коллоидного раствора частиц в одну ноздрю. Дважды через 30 мин и 12 ч проводили МРТ-сканирование ОЭ и ОЛ. Накопление наночастиц в этих структурах оценивали с помощью T1-взвешенных МРТ-изображений. В пилотных экспериментах показано, что значения МРТ-сигнала в ОЭ достигают своего максимума через 30 мин после введения, а в ОЛ – через 12 ч.

Для того чтобы исследовать влияние вязкости мукозального слоя на эффективность захвата наночастиц марганца

ОЭ, мышам (для каждого типа наночастиц $n = 6$) за 20 мин до назальной аппликации наночастиц в каждую ноздрю вводили по 10 мкл 0.01 М дитиотреитола, снижающего вязкость продуцируемой слизи, после чего через 30 мин проводили МРТ-сканирование.

МРТ-исследования. Накопление магнитоконтрастных наночастиц в ОЭ и ОЛ мыши исследовано с помощью МРТ на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл.

За 5 мин до исследования мышей обездвигивали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали за счет водного контура в томографическом столике-кроватьке, имевшем температуру поверхности 30 °С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., США), что позволяло контролировать глутину наркоза.

Информация о распределении марганца по структурам мозга мыши получена по результатам T1-взвешенных изображений с использованием метода FLASH (fast low angle shot) со следующими параметрами: импульсная последовательность (TE = 2.5 мс, TR = 200 мс), изображения (размер 2.5×2.5 см; матрица 512×512 точек; толщина среза 0.5 мм; размеры вокселя $75 \text{ мкл} \times 75 \text{ мкл} \times 0.5 \text{ мм}$; расстояние между срезами 0.5 мм; количество срезов 15; ориентация срезов аксиальная). Общее время сканирования составляло 6 мин.

Накопление частиц марганца в клетках ОЭ и ОЛ выражали как отношение уровня МРТ-сигнала в исследуемых структурах к уровню МРТ-сигнала в референсе, которым служила микропробирка с фосфатным буфером (0.5 мл), помещенная вдоль головы мыши. Обработку МРТ-сканов проводили в программе ImageJ.

Статистика. Множественные сравнения средних проводили с помощью LSD-теста (least significant difference). Оценку взаимозависимостей исследуемых признаков проводили при использовании параметрического коэффициента корреляции Пирсона. Данные выражали как средние $\pm$ SE.

Результаты

Характеристика использованных наночастиц. Морфологию и размеры $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{аморф.}}$ и $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{кристал.}}$ (см. рис. 1, а) изучали с помощью ПЭМ. Коллоидный раствор $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{кристал.}}$ сформирован частицами кубической формы. По результатам межплоскостных измерений этот образец состоял из частиц с размерами 50–80 нм, имеющих оформленную кристаллическую решетку, соответствующую сложному оксиду марганца (II, III) Mn_3O_4 (см. рис. 1, а). $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{аморф.}}$ представлял собой коллоидный раствор агломератов сферических частиц с размерами от 30 до 100 нм. Результаты измерения межплоскостных расстояний и низкого контраста частиц на ПЭМ-изображениях позволяют заключить, что эти частицы имеют аморфную структуру (см. рис. 1, а).

Параметры кристаллической решетки трех образцов частиц исследованы методом порошковой дифрактометрии. Идентификация фаз осуществлялась с использованием

базы данных программы Match!, разработанной фирмой Crystal Impact. Установлено, что коллоид $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{кристал.}}$ является монофазным оксидом марганца Mn_3O_4 (см. рис. 1, а). $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{аморф.}}$ имели слабо сформированную кристаллическую решетку, соответствующую оксиду марганца Mn_3O_4 .

Все использованные для интраназального введения образцы частиц находились в коллоидном состоянии. Гидродинамический радиус частиц в суспензии измеряли перед каждой аппликацией методом динамического светового рассеяния. Дзета-потенциал (ζ) определяли с помощью электрофореза в U-образной кювете. Достоверных отличий по этим параметрам в использованных образцах не установлено (см. рис. 1, а).

Для оценки эффективности МРТ-контрастов измеряли $r1$ и $r2$ релаксивность – величины, обратно пропорциональные способности химических соединений сокращать время спин-решетчатой (T1) и спин-спиновой (T2) релаксации. Исследование релаксивности использованных частиц показало, что $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{аморф.}}$ и $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{кристал.}}$ не имели статистически значимых различий по данному параметру (см. рис. 1, б). Из полученных данных следует, что для достижения одного и того же уровня МРТ-сигнала необходимо в первом приближении одинаковое количество частиц $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{аморф.}}$ и $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{кристал.}}$. Для того чтобы оценить вклад в наблюдаемые эффекты возможного частичного растворения кристаллических и аморфных $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}$, проведена оценка растворимости используемых частиц при различных pH в биологических средах. Показано, что при pH 6.0–7.5 за сутки растворению подвергается менее 0.1 % от массы всех частиц в растворе. При pH = 4.0, соответствующей физиологической pH, за сутки растворяется менее 8 % от массы всех частиц в растворе (рис. 2, б, в). Таким образом, учитывая, что pH мукозального слоя колеблется в пределах 6.8–7.8 (Lai et al., 2009), при исследовании проницаемости мукозального слоя для наночастиц растворением $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}$ при взаимодействии с муцином можно пренебречь, а возможный вклад частичного растворения $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}$ в изменение уровня МРТ-сигнала в луковицах мышей после их захвата клетками эпителия будет так или иначе пропорционален количеству захваченных частиц, что может вносить систематическую ошибку в пределах 8 %, но не мешает проводить межгрупповые сравнения.

Интраназальное введение наночастиц марганца. Накопление в ОЭ наночастиц марганца, оцененное как уровень МРТ-сигнала в клетках назального эпителия через 30 мин после введения коллоидных растворов, было достоверно выше для наночастиц $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{аморф.}}$ по сравнению с таковым для $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{кристал.}}$ (рис. 3, а, б; LSD-тест, $p < 0.05$).

Назальная аппликация муколитика за 20 мин до введения коллоидных растворов полностью нивелировала различия по уровню МРТ-сигнала в ОЭ между исследуемыми наночастицами. Это было достигнуто за счет того, что введение муколитика, не влияя на накопление в ОЭ $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{аморф.}}$, достоверно усиливало проникновение в ОЭ $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-HЧ}_{\text{кристал.}}$ (см. рис. 3, а). Повторная томография задействованных в экспериментах животных показала, что значения МРТ-сигнала в ОЛ через 12 ч после

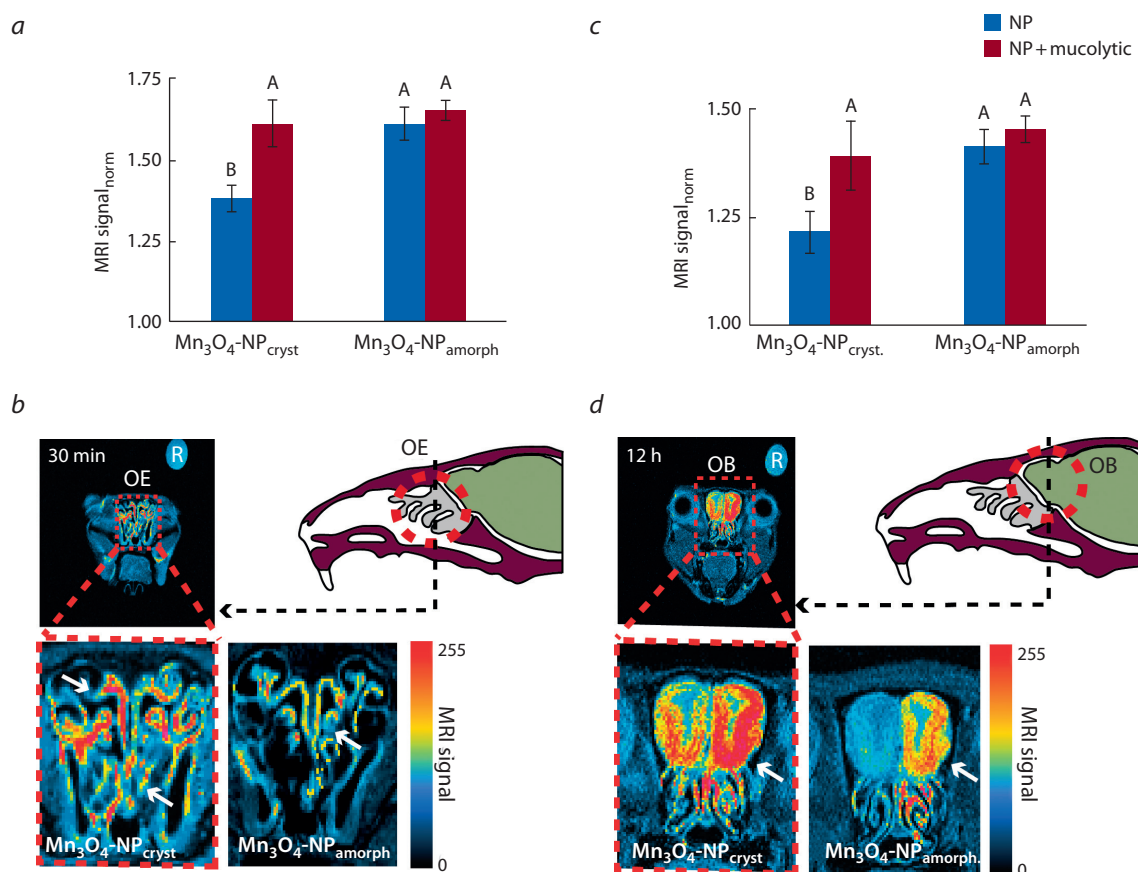


Fig. 3. Accumulation of amorphous and crystalline Mn₃O₄ nanoparticles after intranasal application.

(a) The effect of a mucolytic (dithiothreitol) on the accumulation of amorphous and crystalline particles in OE after intranasal application. The accumulation of nanoparticles in tissues was assessed from MRI responses in T1-weighted images normalized to the reference. (b) Coronal T1-weighted MR images of the nasal cavity taken 30 min after intranasal application of the colloid solution of the particles. (c) The effect of the mucolytic on the accumulation of amorphous and crystalline particles in OB after intranasal application. The accumulation of nanoparticles in tissues was assessed from MRI responses in T1-weighted images normalized to the reference. (d) Coronal T1-weighted MR images of OB taken 12 h after intranasal application of MnO-NP, Mn₂O₃-NP, and Mn₃O₄-NP. White arrows indicate hyperintensity sites apparent from the accumulation of manganese oxide particles; R, the reference (phosphate-buffered saline). A, B, significance of differences between mean values (LSD test, $p < 0.05$). *Differences significant at $p < 0.05$ according to the Student *t* test.

аппликации наночастиц высокодостоверно коррелировала ($r = 0.82$) с уровнем МРТ-сигнала в ОЭ, измеренным через 30 мин после введения наночастиц (см. рис. 3, в). При этом в экспериментах без предварительного введения муколитика большее накопление марганца отмечено для Mn₃O₄-НЧ_{аморф.} по сравнению с Mn₃O₄-НЧ_{кристал.} (см. рис. 3, в, г). Как и в случае с ОЭ, предварительное введение муколитика нивелировало различия между группами по уровню МРТ-сигнала в ОЛ (см. рис. 3, в).

Обсуждение

Эффективность нейронального захвата и транспорта наночастиц во многом зависит от их свойств – размера, гидрофобности, дзета-потенциала (Lai et al., 2009). Менее изучена роль кристаллической или аморфной структуры наночастиц. В данной работе проведено сравнительное исследование способности к перемещению из носовой полости в мозг аморфных и кристаллических наночастиц оксидов марганца. Полуколичественная оценка их накопления выполнена на основе значений позитивного

контраста на T1-взвешенных МРТ-изображениях ОЭ. Как следует из наших результатов, величина МРТ-сигнала высокодостоверно коррелирует с содержанием марганца в тканях мозга (Moshkin et al., 2014).

Поскольку значительных различий в контрастных свойствах (релаксивности) и размере (гидродинамический радиус, диаметр «зерен») используемых наночастиц не наблюдалось, можно заключить, что для достижения одного и того же уровня МРТ-сигнала в ОЛ и ОЭ необходимо одно и то же количество наночастиц. Таким образом, мы показали, что проникновение Mn₃O₄-НЧ_{аморф.} из носовой полости в мозг происходит более эффективно по сравнению с Mn₃O₄-НЧ_{кристал.}

Первым барьером на пути проникновения наночастиц из носовой полости в мозг является мукозальный слой, покрывающий поверхность ОЭ. На эффективность проникновения через мукозальный слой и последующего ольфакторного захвата твердых частиц могут влиять как их размеры, химический состав и поверхностный заряд, так и менее очевидные свойства, как, например, структура

кристаллической решетки. Ранее было продемонстрировано, что в ЦНС с помощью назального транспорта проникают в мозг преимущественно ультратонкие частицы размером < 0.2 мкм (Mistry et al., 2009). Известно, что частицы с отрицательным и нейтральным поверхностным зарядом преодолевают мукозальный слой лучше, чем частицы с положительным зарядом (Norris, Sinko, 1997; Mistry et al., 2009). Кроме того, показано, что совместное использование наночастиц и муколитиков, меняющих вязкость продуцируемой слизи, увеличивает эффективность проникновения частиц через мукозальный слой (Ferrari et al., 2001).

Для проверки гипотезы о том, что наблюдаемые различия в накоплении интраназально введенных наночастиц в головном мозге связаны с более эффективным проникновением аморфных частиц через мукозальный слой по сравнению с кристаллическими, мы предварительно обрабатывали носовую полость раствором муколитика. Согласно полученным результатам, интраназальное введение муколитика не повлияло на эффективность проникновения аморфных Mn_3O_4 -НЧ, увеличив при этом накопление в ОЭ и ОЛ кристаллических Mn_3O_4 -НЧ. Учитывая отсутствие значимых различий по гидродинамическим размерам и поверхностному потенциалу между кристаллическими и аморфными наночастицами, можно предположить, что большее накопление Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} в ОЛ при их интраназальной аппликации обусловлено тем, что для этих частиц мукозальный слой ОЭ более проницаем в сравнении с Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} Возможно, гидрофильность аморфных частиц выше, чем кристаллических, что, как следует из данных, полученных *in vitro*, может значительно увеличить интенсивность их проникновения через мукозальный слой (Lai et al., 2009). Это подтверждается рядом теоретических и экспериментальных исследований, в которых показано, что по мере уменьшения степени упорядоченности кристаллической структуры химического соединения возрастает его гидрофильность (Hancock, Parks, 2000; Gupta et al., 2004; Good, Rodríguez-Hornedo, 2009; Murdande et al., 2010). Кроме того, для некоторых слаборастворимых фармпрепаратов показано, что использование более гидрофильных аморфных форм позволяет увеличить по сравнению с кристаллическими биодоступность соединения за счет увеличения концентрации частиц в предъявляемом коллоидном растворе (Miyazaki et al., 1975; Yang et al., 2010).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что аморфные и кристаллические наночастицы оксидов марганца существенно различаются по эффективности преодоления мукозального слоя ОЭ и, соответственно, по способности к проникновению из носовой полости в мозг. Эти сведения могут быть полезны при разработке подходов к оценке токсикологической опасности воздушной среды, поскольку известно, что в состав промышленных твердых аэрозолей входят не только кристаллические, но и аморфные формы оксидов металлов (Minni et al., 1984; Antonini et al., 2006). Кроме того, понимание существенного влияния мукозального слоя на эффективность транспорта наночастиц может найти приложение при разработке ингаляционных методов терапевтического воздействия.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-74-10081. Work in the Shared Access Center was supported by the Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Antonini J.M., Santamaria A.B., Jenkins N.T., Albin E., Lucchini R. Fate of manganese associated with the inhalation of welding fumes: potential neurological effects. *Neurotoxicology*. 2006;27(3):304-310.
- Barman S.C., Singh R., Negi M.P.S., Bhargava S.K. Fine particles (PM_{2.5}) in ambient air of Lucknow city due to fireworks on Diwali festival. *J. Environ. Biol.* 2009;30(5):625-632.
- Borm P.J.A. Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. *Inhal. Toxicol.* 2002;14(3):311-324.
- Brook R.D., Bard R.L., Burnett R.T., Shin H.H., Vette A., Croghan C., Phillips M., Rodes C., Thornburg J., Williams R. Differences in blood pressure and vascular responses associated with ambient fine particulate matter exposures measured at the personal versus community level. *Occup. Environ. Med.* 2010;68:224-230.
- Chen Z., Meng H., Xing G., Yuan H., Zhao F., Liu R., Chang X., Gao X., Wang T., Jia G. Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: nanotoxicity has susceptible population. *Environ. Sci. Technol.* 2008;42(23):8985-8992.
- Crater J.S., Carrier R.L. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. *Macromol. Biosci.* 2010;10(12):1473-1483.
- Donaldson K., Brown D., Clouter A., Duffin R., MacNee W., Renwick L., Tran L., Stone V. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* 2002;15(2):213-220.
- Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ. Health Perspect.* 2006;114(8):1172-1178.
- Evdokov O.V., Titov V.M., Tolochko B.P., Sharafutdinov M.R. In situ time-resolved diffractometry at SSTRC. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A*. 2009;603(1):194-195.
- Ferrari S., Kitson C., Farley R., Steel R., Marriott C., Parkins D.A., Scarpa M., Wainwright B., Evans M.J., Colledge W.H. Mucus altering agents as adjuncts for nonviral gene transfer to airway epithelium. *Gene Therapy*. 2001;8(18):1380-1386.
- Genter M.B., Newman N.C., Shertzer H.G., Ali S.F., Bolon B. Distribution and systemic effects of intranasally administered 25 nm silver nanoparticles in adult mice. *Toxicol. Pathol.* 2012;40(7):1004-1013.
- Good D.J., Rodríguez-Hornedo N. Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 2009;9(5):2252-2264.
- Gupta P., Chawla G., Bansal A.K. Physical stability and solubility advantage from amorphous celecoxib: the role of thermodynamic quantities and molecular mobility. *Mol. Pharm.* 2004;1(6):406-413.
- Hancock B.C., Parks M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res.* 2000;17(4):397-404.
- Heusinkveld H.J., Wahle T., Campbell A., Westerink R.H.S., Tran L., Johnston H., Stone V., Cassee F.R., Schins R.P.F. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology*. 2016;56:94-106.
- Iqbal A., Ahmad I., Khalid M.H., Nawaz M.S., Gan S.H., Kamal M.A. Nanoneurotoxicity to nanoneuroprotection using biological and computational approaches. *J. Environ. Sci. Health. C*. 2013;31(3):256-284.
- Kampfrath T., Maisiey A., Ying Z., Shah Z., Deilius J.A., Xu X., Kherada N., Brook R.D., Reddy K.M., Padture N.P. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. *Circ. Res.* 2011;108(6):716-726.

- Kittelson D.B., Watts W.F., Johnson J.P. Nanoparticle emissions on Minnesota highways. *Atmos. Environ.* 2004;38(1):9-19.
- Kreyling W.G. Discovery of unique and ENM-specific pathophysiologic pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016;299: 41-46.
- Lai S.K., O'Hanlon D.E., Harrold S., Man S.T., Wang Y.-Y., Cone R., Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(5):1482-1487.
- Lai S.K., Wang Y.-Y., Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009;61(2):158-171.
- Minni E., Gustafsson T.E., Koponen M., Kalliomaki P.-L. A study of the chemical structure of particles in the welding fumes of mild and stainless steel. *J. Aerosol Sci.* 1984;15(1):57-68.
- Mistry A., Glud S.Z., Kjems J., Randel J., Howard K.A., Stolnik S., Illum L. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *J. Drug Targeting.* 2009;17(7):543-552.
- Miyazaki S., Hori R., Arita T. Physico-chemical property and gastrointestinal absorption of some solid phases to tetracycline. *Yakugaku Zasshi.* 1975;95(6):629.
- Morales J.A., Herzog S., Kompter C., Frese K., Rott R. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med. Microbiol. Immunol.* 1988;177(2):51-68.
- Moshkin M.P., Petrovski D.V., Akulov A.E., Romashchenko A.V., Gerlinskaya L.A., Ganimedov V.L., Muchnaya M.I., Sadovsky A.S., Koptuyug I.V., Savelov A.A. Nasal aerodynamics protects brain and lung from inhaled dust in subterranean diggers, *Ellobius talpinus*. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2014;281(1792). DOI 10.1098/rspb.2014.0919.
- Murdande S.B., Pikal M.J., Shanker R.M., Bogner R.H. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: I. A thermodynamic analysis. *J. Pharm. Sci.* 2010;99(3):1254-1264.
- Norris D.A., Sinko P.J. Effect of size, surface charge, and hydrophobicity on the translocation of polystyrene microspheres through gastrointestinal mucin. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997;63(11):1481-1492.
- Parmalee N.L., Aschner M. Manganese and aging. *Neurotoxicology.* 2016;56:262-268.
- Patchin E.S., Anderson D.S., Silva R.M., Uyeminami D.L., Scott G.M., Guo T., Van Winkle L.S., Pinkerton K.E. Size-dependent deposition, translocation, and microglial activation of inhaled silver nanoparticles in the rodent nose and brain. *Environ. Health Persp.* 2016; 124(12):1870. DOI 10.1289/EHP1234.
- Ryzhikov A.B., Ryabchikova E.I., Sergeev A.N., Tkacheva N.V. Spread of Venezuelan equine encephalitis virus in mice olfactory tract. *Arch. Virol.* 1995;140(12):2243-2254.
- Sharma V., Kumar A., Dhawan A. Nanomaterials: exposure, effects and toxicity assessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B: Biol. Sci.* 2012;82(1):3-11.
- Stroop W.G., Rock D.L., Fraser N.W. Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory systems of the mouse central nervous system during acute and latent infections by in situ hybridization. *Lab. Invest.* 1984;51(1):27-38.
- Trickler W.J., Lantz S.M., Schrand A.M., Robinson B.L., Newport G.D., Schlager J.J., Paule M.G., Slikker W., Biris A.S., Hussain S.M. Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine.* 2012;7(6):835-846.
- Wu J., Wang C., Sun J., Xue Y. Neurotoxicity of silica nanoparticles: brain localization and dopaminergic neurons damage pathways. *ACS Nano.* 2011;5(6):4476-4489.
- Yang W., Johnston K.P., Williams R.O. Comparison of bioavailability of amorphous versus crystalline itraconazole nanoparticles via pulmonary administration in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010;75(1): 33-41.

Моделирование болезни Хантингтона на клетках линии HEK293

Д.В. Шарипова^{1, 2, 3}, Т.Б. Маланханова^{1, 2, 3, 4}, А.А. Малахова^{1, 2, 3, 4}✉

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Болезнь Хантингтона – наследственное нейродегенеративное заболевание человека, которое вызвано мутацией в гене *HTT*. Мутантный белок HTT имеет удлинённый полиглутаминовый тракт и образует агрегаты в ядре и цитоплазме средних шипиковых нейронов стриатума, приводя их к гибели. Механизмы развития заболевания до конца не изучены, ввиду ограниченной доступности биоматериала и позднего проявления болезни. Именно поэтому одной из актуальных задач является создание модельных систем болезни Хантингтона на основе культивируемых клеток человека. Сочетание клеточных технологий и системы редактирования генома CRISPR/Cas9 позволит изучать молекулярные и клеточные механизмы развития патологии. Ранее в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН была разработана методика внесения мутации, вызывающей болезнь Хантингтона, в геном клеток человека и получены мутантные клоны клеток линии HEK293, моделирующие болезнь Хантингтона. В данной работе мы показали, что мутантные клетки частично воспроизводят патологический фенотип, а именно: обладают сниженной пролиферативной активностью, повышенным уровнем апоптоза и высокой чувствительностью к ингибитору протеасом (MG132). Полученные результаты свидетельствуют о том, что мутация, вызывающая болезнь Хантингтона, влияет не только на нейроны, но и на другие типы клеток.

Ключевые слова: болезнь Хантингтона; клеточные модели; редактирование генома.

Huntington's disease modeling on HEK293 cell line

D.V. Sharipova^{1, 2, 3}, T.B. Malankhanova^{1, 2, 3, 4}, A.A. Malakhova^{1, 2, 3, 4}✉

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Meshalkin National Medical Research Center of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Huntington's disease is a hereditary neurodegenerative disorder caused by CAG trinucleotide repeat expansion in the first exon of *HTT* gene. The mutant HTT protein has an elongated polyglutamine tract and forms aggregates in the nuclei and cytoplasm of the striatal neurons. The pathological processes occurring in the medium spiny neurons of Huntington's disease patients lead to neurodegeneration and consequently to the death. The molecular mechanisms of the pathology development are difficult to study due to the limited material availability and late onset of the manifestation. Therefore, one of the important tasks is generation of an *in vitro* model system of Huntington's disease based on human cell cultures. The new genome editing approaches, such as CRISPR/Cas9, allow us to generate isogenic cell lines that can be useful for drug screening and studying mechanisms of molecular and cellular events triggered by certain mutation on an equal genetic background. Here, we investigated the viability and proliferative rate of several mutant HEK293 cell clones with mutations in the first exon of *HTT* gene. The mutant clones were obtained earlier using CRISPR/Cas9 genome editing technology. We showed that mutant cells partially reproduce the pathological phenotype, that is, they have reduced proliferation activity, an increased level of apoptosis and high sensitivity to treatment with 5 μM MG132 proteasome inhibitor compared to the original HEK293 Phoenix cell line. Our results indicate that the mutation in the first exon of *HTT* gene affects not only neurons, but also other types of cells, and HEK293 cell clones bearing the mutation can serve as *in vitro* model for studying some mechanisms of HTT functioning.

Key words: Huntington's disease; cell models; genome editing.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шарипова Д.В., Маланханова Т.Б., Малахова А.А. Моделирование болезни Хантингтона на клетках линии HEK293. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):856-861. DOI 10.18699/VJ17.306

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sharipova D.V., Malankhanova T.B., Malakhova A.A. Huntington's disease modeling on HEK293 cell line. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):856-861. DOI 10.18699/VJ17.306 (in Russian)

Болезнь Хантингтона (БХ) – нейродегенеративное заболевание, которое наследуется по аутосомно-доминантному типу и характеризуется прогрессирующей хореей, когнитивными изменениями и деменцией (Martin, Gusella, 1986). БХ встречается приблизительно в семи-десяти случаях на 100 000 человек. Это заболевание вызвано экспансией тринуклеотидных повторов CAG (цитозин-аденин-гуанин) в первом экзоне гена *HTT* (Huntingtin), расположенном на коротком плече хромосомы 4 (4p16.3). В норме количество триплетов CAG варьирует от 9 до 36, у больных пациентов их число может достигать 115. Обычно первые симптомы начинают проявляться в возрасте 35–45 лет. При этом время начала болезни коррелирует с длиной тракта повторов CAG: чем их больше, тем раньше проявляется заболевание (Walker, 2007).

Удлиненный тракт тринуклеотидных повторов CAG в гене приводит к образованию протяженного полиглутаминового (PolyQ) тракта в синтезируемом белке хантингтин (MacDonald et al., 1993). Вследствие возникновения этого тракта мутантный хантингтин перестает выполнять свою физиологическую функцию в клетках, а также нарушает работу и транспорт митохондрий (Org et al., 2009; Mochel, Haller, 2011; Song et al., 2011), транскрипционный аппарат (Baydyuk, Xu, 2012; Seredenina, Luthi-Carter, 2012) и другие клеточные процессы. В дальнейшем мутантный белок образует цитоплазматические агрегаты и ядерные включения в средних шипиковых нейронах стриатума, а на поздних стадиях заболевания – в клетках коры головного мозга (Labbadia, Morimoto, 2013).

В настоящее время БХ является неизлечимой, и ее терапия сводится к применению симптоматических средств, которые могут временно улучшить состояние больного, но не дадут стабильного пожизненного результата. Это связано с тем, что в деталях все тонкости патогенеза не изучены, поэтому затруднителен выбор потенциальных терапевтических мишеней. Поскольку этим заболеванием страдают только люди, создание модели, наиболее точно воспроизводящей патологические процессы (на основе человека), невозможно по этическим причинам. Модели БХ на основе животных демонстрируют моторные и когнитивные симптомы и фенотипические признаки заболевания, и их широко используют в исследованиях (Ramaswamy et al., 2007). Однако такие модели не могут в полной мере отражать и воспроизводить все аспекты БХ у человека ввиду значительных генетических различий и относительно короткой продолжительности жизни исследуемых организмов. Поэтому наиболее подходящим объектом для исследования БХ считаются модельные системы на основе культивируемых клеток человека.

В последние несколько лет исследователи активно применяют технологию редактирования генома CRISPR/Cas9 на культивируемых клетках человека (Freiermuth et al., 2017). Система CRISPR/Cas9 позволяет эффективно и направленно модифицировать геном клеток. Так, уже получены линии клеток от пациентов, страдающих БХ, с исправленной мутацией (An et al., 2012).

Ранее были получены клоны клеток линии HEK293, несущие различные мутации (встройки удлиненного тракта CAG и делеции разного размера) в первом экзоне гена *HTT* (Малахова и др., 2016). Эта линия клеток была выбрана

для исследования в связи с тем, что ее легко культивировать и она хорошо поддается различным генетическим манипуляциям. Кроме того, клетки HEK293 обладают некоторыми нейральными свойствами (Shaw et al., 2002), что позволяет проводить корреляции с процессами, происходящими в нейронах. В данной работе мы исследовали влияние мутантного белка HTT на пролиферацию, уровень апоптоза и другие показатели жизнеспособности клеток линии HEK293 с целью оценки способности мутантных клонов HEK293 моделировать БХ *in vitro*.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Работа проводилась на культуре клеток HEK293 (human embryonic kidney). Всего в работе исследовали восемь линий HEK293 с мутациями в первом экзоне гена *HTT*: со встройками удлиненных трактов тринуклеотидных повторов (4В, 6Н, 5С, 3В), делециями (8Н, 8D), встройкой и делецией (4Е). Наличие мутации в первом экзоне гена *HTT* подтверждали с помощью стандартной ПЦР (последовательности праймеров приведены в табл. 1). В качестве отрицательного контроля использована линия HEK293 Phoenix (Ph). Клетки культивировали в среде, содержащей 45 % DMEM, 45 % F12, 10 % FBS, 1 мМ L-глутамин (Thermo Fisher Scientific), 1 % Pen-Strep (Lonza).

Иммунофлуоресценция. Клетки фиксировали с помощью 4 % параформальдегида (ПФА) 15 мин, пермеабелизовали в 0.5 % Triton X-100 в течение 30 мин, затем добавляли 1 % BSA в PBS (блокирующий буфер) на 30 мин. Инкубировали с первичными антителами 16 ч при 4 °С, затем со вторыми антителами – 2 ч при комнатной температуре и 5 мин с 1 мкг/мл DAPI (Sigma). Используемые антитела указаны в табл. 2. Визуализировали на микроскопе Nikon Ti-Eclipse с помощью программного обеспечения фирмы. Для теста на чувствительность к ингибитору протеасом MG132 инкубировали клетки с 5 мкМ MG132 (Santa Cruz) 12 ч перед фиксацией.

Тест на активность пролиферации. Активность пролиферации клеток исследовали с помощью набора Cell Proliferation Kit II XTT (Roche) по протоколу производителя через 2.5 ч после добавления реагентов. Клетки рассаживали по $5 \cdot 10^4$ на лунку 96-ячеечного планшета. Оптическую плотность образцов измеряли с использованием сканирующего спектрофотометра Perkin Elmer (2030 Multilabel Reader Victor X3) на 2-й, 3-й и 4-й день после пересадки.

Тест на уровень апоптоза. Уровень апоптоза клеток исследовали с помощью набора ApoDETECT Annexin V-FITC Kit (Life Technologies) по протоколу производителя и анализировали с помощью проточной цитометрии на сортере клеток S3e Bio-Rad.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных для тестов на уровень пролиферации и апоптоза проводили в программе R. Достоверность отличий оценивали с помощью критерия Вилкоксона.

Выделение РНК, синтез кДНК и ОТ-ПЦР. РНК выделяли из культур клеток с помощью TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific), согласно инструкции производителя. Синтез кДНК осуществляли с использованием фермента обратной транскриптазы (ОТ) SuperScriptIII (Invitrogen).

Table 1. Primers

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>gDNA_HTT</i>	CCCAAGGCCACCTCGGCTCAGAGTC	CGCAGGCTGCAGGGTTACCGCCATC
<i>cDNA_HTT</i>	AGGAGCTCTCCTTCTCTCCG	TTCTCCGGAACATTCCAGACTTG
<i>cDNA_GAPDH</i>	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	CTCCACGACGTACTCAGCG

Table 2. Antibodies

Antibody	Isotype	Dilution	Manufacturer	Catalog No.
Primary antibodies				
Anti-PolyQ	Mouse monoclonal, IgG1k	1:1000	Millipore	MAB1574
Anti-Neurofilament 200	Rabbit polyclonal	1:1000	Sigma	N4142
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	»	1:200	Millipore	AB5804
Anti-Vimentin	»	1:200	Abcam	ab45939
Anti-S100B	Mouse monoclonal, IgG1k	1:500	Sigma	SAB1402349
Anti-IsI1	Rabbit polyclonal	1:500	Abcam	ab20670
Secondary antibodies				
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG1	Goat polyclonal	1:400	Thermo Fisher Scientific	A21121
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L)	»	1:400	»	A11008
Alexa Fluor 568 goat anti mouse IgG (H+L)	»	1:400	»	A11004

ОТ-ПЦР проводили в стандартных условиях с использованием праймеров, приведенных в табл. 1.

Результаты

Экспрессия нейральных маркеров в линии клеток НЕК293. Чтобы подтвердить экспрессию маркеров нейральных клеток в клетках линии НЕК293, проведено иммунофлуоресцентное окрашивание. Выявлено, что эта клеточная линия экспрессирует Vimentin и ISL1 – маркеры предшественников нейронов и маркеры астроцитов GFAP и S100B (рис. 1, а, б, в, д). Также в отдельных клетках наблюдается экспрессия нейрофиламента NF200 (см. рис. 1, е).

Экспрессия *HTT* в мутантных клонах линии НЕК293. Исследовано восемь линий НЕК293, имеющих в первом экзоне гена *HTT* встройки либо делеции разного размера (рис. 2).

Для подтверждения экспрессии *HTT* в исследуемых линиях клеток проведена ОТ-ПЦР. Показано, что *HTT* экспрессируется как в линии клеток без мутаций, так и в мутантных клетках (рис. 3). В качестве положительного контроля проведена ОТ-ПЦР на экспрессию гена *GAPDH*.

Отсутствие белковых агрегатов в мутантных клетках и их повышенная чувствительность к ингибитору протеасом. Для выявления наличия белковых агрегатов проведено иммунофлуоресцентное окрашивание антителами на PolyQ-тракт. Для этого были выбраны три линии: Phoenix с нормальными аллелями *HTT*, 4В с двумя

мутантными аллелями и 6Н с одним нормальным и одним мутантным аллелем. Показано, что белковые агрегаты ни в одной из клеточных линий не формируются (рис. 4, а). Известно, что при воздействии на клетки веществом MG132, которое является ингибитором протеасом, может повышаться количество цитоплазматических включений в клеточных линиях, имеющих мутации в гене *HTT* (Jeon et al., 2012). Поэтому с целью инициирования образования белковых агрегатов клетки перед окрашиванием инкубировали с 5 мкМ MG132, однако агрегаты также не были выявлены. Мутантные линии 4В и 6Н в присутствии ингибитора протеасом MG132 визуально демонстрировали повышенный уровень клеточной гибели по сравнению с контрольной линией (см. рис. 4, б).

Отрицательное влияние мутаций на жизнеспособность клеток. С помощью окраски на Annexin V/PI выявлены следующие группы клеток: живые, окрашивающиеся на ранние маркеры апоптоза; погибшие от апоптоза (поздний апоптоз); погибшие от некроза (табл. 3). Между мутантными линиями и контролем (Phoenix) наблюдалась тенденция к увеличению количества клеток, окрашивающихся на ранние маркеры апоптоза (см. табл. 3, значения первого столбца). Разброс значений представлен на рис. 5. По сравнению с линией без мутации доля клеток, погибающих от апоптоза, в некоторых мутантных линиях имеет тенденцию к увеличению. Это линии, несущие встройки удлиненного тракта тринуклеотидных повторов CAG (3В, 5С, 6Н), и линия, несущая и встройку, и делецию (4Е).

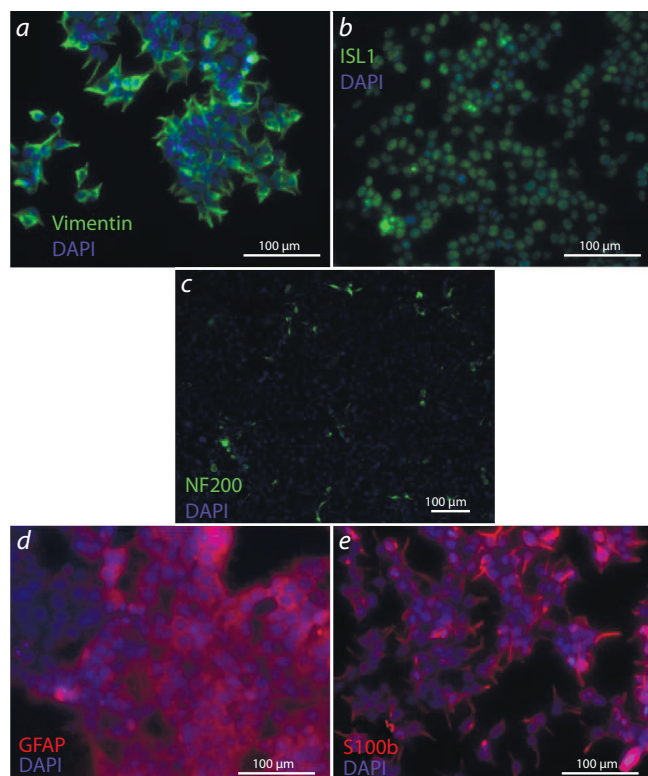


Fig. 1. Fluorescence of neural markers in HEK293 cells.

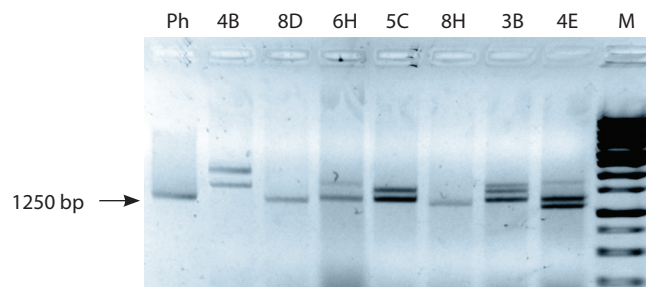


Fig. 2. PCR-based confirmation of mutations in the first exon of *HTT* in HEK293 clones.

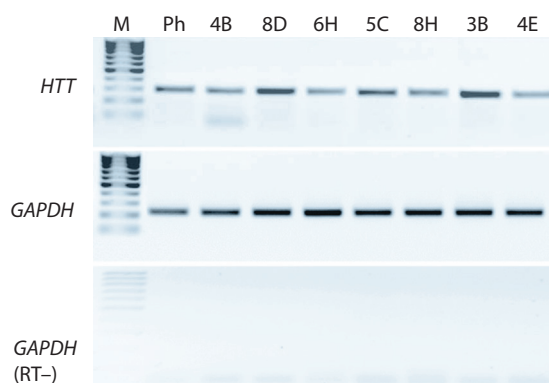


Fig. 3. RT-PCR-based confirmation of *HTT* expression in HEK293 clones.

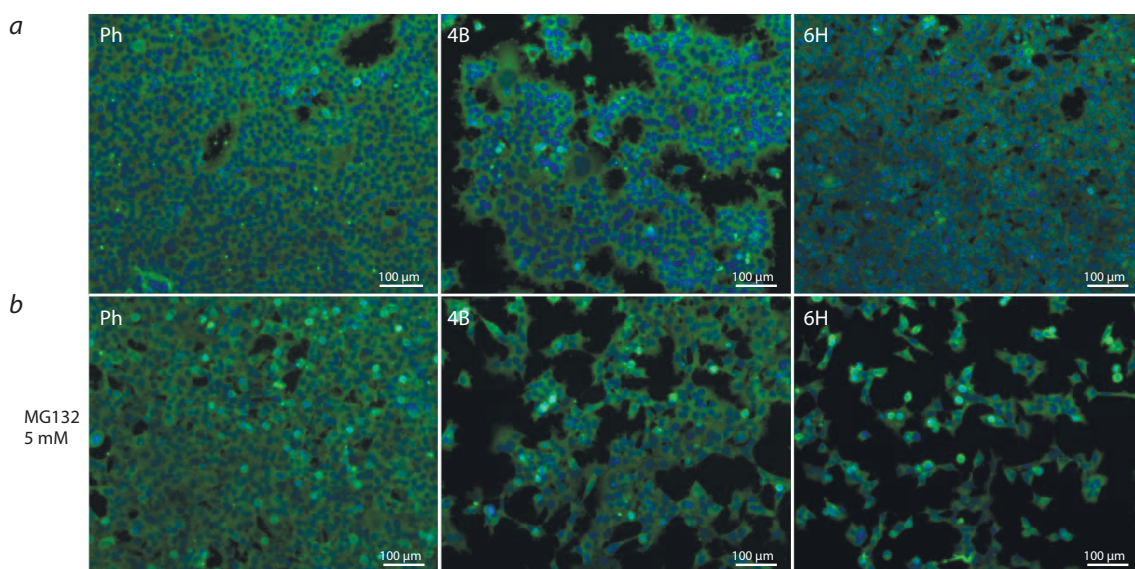


Fig. 4. PolyQ fluorescence in HEK293 clones.

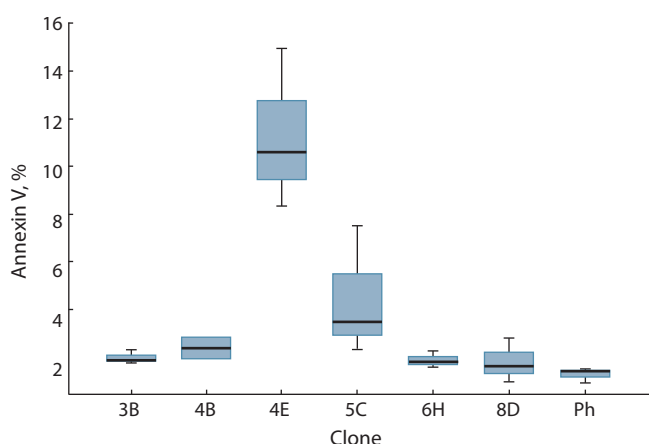
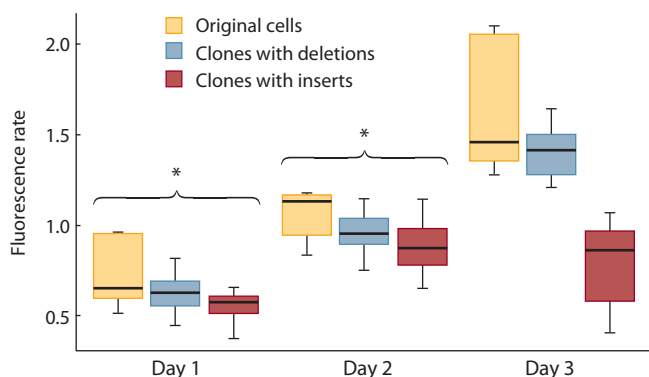
(a) immunostaining without MG132, (b) immunostaining after treatment with 5 µM MG132.

Сниженная пролиферативная активность мутантных клеток. В результате анализа клеток на уровень пролиферативной активности выявлено, что мутантные линии пролиферируют медленнее (рис. 6). Для наглядности полученные данные были объединены в три группы: линии клеток со встройками в первом экзоне гена *HTT*

(6H, 3B, 5C), линии клеток с делециями (8D и 8H) и линия без мутации в гене *HTT* (Phoenix). Статистическая обработка данных показала достоверное отличие в скорости пролиферации групп линий на 1-й и 2-й день: линии со встройками пролиферируют медленнее. На 3-й день отличие в скорости пролиферации недостоверно.

Table 3. Annexin V/PI staining of HEK293 clones

Clone	Annexin+ / PI- cells, % Early apoptosis)			Annexin+ / PI+ cells, % Late apoptosis)			Annexin- / PI+ cells, % (Necrosis)		
Ph	1.41	0.91	1.50	2.78	2.04	1.58	10.93	8.26	8.22
8D	1.60	2.78	0.97	1.59	2.42	1.11	4.31	6.83	7.06
4B	2.81	1.91	11.97	2.14	1.68	3.96	14.13	9.79	15.74
4E	14.93	10.59	8.32	11.41	7.39	2.59	12.81	9.76	14.30
3B	1.85	1.74	2.28	1.57	1.70	1.83	4.79	6.25	5.24
6H	2.24	1.56	1.79	2.23	1.69	2.78	6.49	5.22	6.08
5C	7.50	3.47	2.32	2.32	2.38	2.61	8.52	5.74	5.77

**Fig. 5.** Data scattering in the analysis of apoptosis level in HEK293 clones.**Fig. 6.** Analysis of proliferation levels in HEK293 cell clones.

The proliferation rate of clones with deletions does not differ from the Phoenix control line ($p > 0.05$). The proliferation rates of clones carrying inserts differ significantly from the Phoenix control line on the first ($p = 0.04719$) and second ($p = 0.02244$) days of measurements. On the third day, the difference is insignificant ($p > 0.05$).

Обсуждение

В настоящей работе исследовано влияние мутаций в первом экзоне гена *HTT* на жизнедеятельность клеток линии HEK293 с помощью различных методов анализа. Мы показали, что линия HEK293 обладает некоторыми свойствами нейральных клеток, поэтому может быть использована в исследовании отдельных механизмов развития нейродегенеративных заболеваний.

Несмотря на то что экспрессия *HTT* подтвердилась во всех исследуемых клеточных линиях, белковых агрегатов в цитоплазме мутантных клеток не наблюдалось. Возможно, белковые агрегаты формируются только в клетках с низкой пролиферативной активностью, долгой продолжительностью жизни и длинным клеточным циклом, когда не происходит ремоделирования цитоплазмы (Curgais et al., 2017; Kim et al., 2017). Такими характеристиками обладают нейроны, однако остается неясным, почему при БХ погибают преимущественно средние шипиковые нейроны стриатума.

Не обнаружив внутриклеточных агрегатов в мутантных клетках, мы решили индуцировать их формирование с помощью ингибитора протеасом MG132, так как ранее в исследованиях его уже использовали в этих целях (Jeon et al., 2012; Nekrasov et al., 2016). В ходе этого эксперимента показано, что белковые агрегаты также не образуются, но клетки, несущие мутацию, более чувствительны к добавлению ингибитора. Возможно, это связано с тем, что не только наличие мутантного НТТ может приводить к гибели клеток, но также недостаток НТТ дикого типа значительно сказывается на их выживаемости. НТТ выполняет важную роль в регуляции аутофагии: он участвует в формировании и транспортировке аутофагосом внутри клеток (Martin et al., 2015). Таким образом, в условиях отсутствия или нехватки нормального белка дополнительное ингибирование другого пути утилизации отработавших белков – протеолиза – является критичным для жизнеспособности клеток.

При оценке жизнеспособности клеток мы обнаружили, что клетки со встройкой удлинённого тракта повторов СAG характеризуются более высоким уровнем апоптоза по сравнению как с отрицательным контролем (Phoenix), так с линией, несущей делецию. Более того, активность пролиферации в первые два дня достоверно снижена только у клеточных линий со встройками. На 3-й день анализа это отличие недостоверно, что может быть связано с тем, что скорость пролиферации контрольной линии Phoenix вышла на плато. Различий между пролиферативной активностью контрольной линии и линиями с делециями не обнаружено ни в один из дней эксперимента. Это свидетельствует о том, что наличие полиглютаминового тракта в мутантном белке НТТ оказывает более негативный эффект, чем делеция в соответствующем локусе.

Полученные в нашем исследовании результаты демонстрируют, что мутации в первом экзоне гена *HTT* в клетках

линии HEK293 оказывают негативное влияние на некоторые физиологические свойства клеток. Такая клеточная модель хороша тем, что несмотря на внесенные мутации, клетки остаются жизнеспособными. Это позволит изучать функционирование нормального и мутантного НТТ в течение длительного времени и использовать данные модели для долговременных исследований. Однако, поскольку у человека симптомы БХ начинают проявляться в возрасте примерно 40 лет, вполне вероятно, что для воссоздания более корректного мутантного фенотипа *in vitro* необходимо исследовать нейроны после длительного культивирования. В связи с тем, что именно средние шипиковые нейроны стриатума наиболее подвержены влиянию мутантного НТТ, исследование этого типа клеток позволит получить наиболее точные результаты. Поэтому для моделирования БХ *in vitro* необходимо также получать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, несущие необходимую мутацию, и дифференцировать их в релевантные типы клеток.

В этом исследовании мы подтвердили экспрессию нескольких нейральных маркеров в клетках HEK293 и продемонстрировали, что внесенные мутации оказывают влияние на различные физиологические показатели полученных клеток, такие как скорость пролиферации, уровень апоптоза в нормальных условиях и при клеточном стрессе. Таким образом, мутации, вызывающие БХ, оказывают негативный эффект не только на те типы клеток, которые традиционно считаются ключевыми в развитии патологического фенотипа, но и, в частности, на клетки линии HEK293.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-15-10128.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- An M.C., Zhang N., Scott G., Montoro D., Wittkop T., Melov S., Ellerby L.M. Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012;11(2):253-263. DOI 10.1016/j.stem.2012.04.026.
- Baydyuk M., Baoji X. BDNF in Huntington's disease: role in pathogenesis and treatment. *Huntington's Disease – Core Concepts and Current Advances*. InTech, 2012;495-507.
- Currais A., Fisher W., Maher P., Schubert D. Intraneuronal protein aggregation as a trigger for inflammation and neurodegeneration in the aging brain. *FASEB J*. 2017;31(1):5-10. DOI 10.1096/fj.201601184.
- Freiermuth J.L., Powell-Castilla I.J., Gallicano I. Toward a CRISPR picture: use of CRISPR/Cas9 to model diseases in human stem cells *in vitro*. *J. Cell. Biochem*. 2017;7(May):1-7. DOI 10.1002/jcb.26162.
- Jeon I., Lee N., Li J., Park I., Park K., Moon J., Shim S.H., Choi C., Chang D., Kwon J., Oh S., Shin D.A., Kim H.S., Do J.T., Lee D.R., Kim M., Kang K., Daley G.Q., Brundin P., Sijhwan S. Neuronal properties, *in vivo* effects and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2012;30:2054-2062. DOI 10.1002/stem.1135.
- Kim M., Ho A., Lee J.H. Autophagy and human neurodegenerative diseases – A fly's perspective. *Int. J. Mol. Sci*. 2017;18(7):1596. DOI 10.3390/ijms18071596.
- Labbadia J., Morimoto R.I. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem. Sci*. 2013;38(4):378-385. DOI 10.1016/j.tibs.2013.05.003.
- MacDonald M.E., Ambrose C.M., Duyao M.P., Myers R.H., Lin C., Srinidhi L., Barnes G., Taylor S.A., James M., Groat N., MacFarlane H., Jenkins B., Anderson M.A., Wexler N.S., Gusella J.F., Bates G.P., Baxendale S., Hummerich H., Kirby S., North M., Youngman S., Mott R., Zehetner G., Sedlacek Z., Poustka A., Frischauf A., Lehrach H., Buckler A.J., Church D., Doucette-Stamm L., O'Donovan M.C., Riba-Ramirez L., Shah M., Stanton V.P., Strobil S.A., Draths K.M., Wales J.L., Dervan P., Housman D.E., Alter M., Shiang R., Thompson L., Fielder T., Wasmuth J.J., Tagle D., Valdes J., Elmer L., Allard M., Castilla L., Swaroop M., Blanchard K., Collins F.C., Snell R., Holloway T., Gillespie K., Dattson N., Shaw D., Harper P.S. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993;72(6):971-983.
- Malakhova A.A., Sorokin M.A., Sorokina A.E., Malankhanova T.B., Mazurok N.A., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. The genome editing approach for generation of isogenic cell lines modelling Huntington's disease *in vitro*. *Geny i kletki = Genes&Cells*. 2016;9(3):106-113. (in Russian)
- Martin D.D., Ladha S., Ehrnhoefer D.E., Hayden M.R. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends Neurosci*. 2015;38(1):26-35. DOI 10.1016/j.tins.2014.09.003.
- Martin J.B., Gusella J.F. Huntington's disease: Pathogenesis and management. *N. Engl. J. Med*. 1986;315:1267-1276.
- Mochel F., Haller R.G. Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J. Clin. Invest*. 2011;121(2):493-499. DOI 10.1172/JCI45691.
- Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vasina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Suldina L.A., Bobrovsky P.A., Zimina O.A., Ryazan-tseva M.A., Skopin A.Y., Illarionov S.N., Kaznacheeva E.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol. Neurodegener*. 2016;11(27):1-15. DOI 10.1186/s13024-016-0092-5.
- Orr A.L., Li S., Wang C., Li H., Wang J., Rong J., Xu X., Mastroberardino P.G., Greenamyre J.T., Li X. N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J. Neurosci*. 2009;28(11):2783-2792. DOI 10.1523/JNEUROSCI.0106-08.2008.
- Ramaswamy S., McBride J.L., Kordower J.H. Animal models of Huntington's disease. *ILAR J*. 2007;48:356-373.
- Seredenina T., Luthi-Carter R. What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiol. Dis*. 2012;45(1):83-98. DOI 10.1016/j.nbd.2011.07.001.
- Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F.L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*. 2002;16:869-871. DOI 10.1096/fj.01.
- Song W., Chen J., Petrilli A., Liot G., Klinglmayr E., Zhou Y., Poquiz P., Tjong J., Pouladi M.A., Hayden M.R., Masliah E., Ellisman M., Rouiller I., Schwarzenbacher R., Bossy B., Perkins G., Bossy-Wetzel E. Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase Drp1 and increases its enzymatic activity. *Nat. Med*. 2011;17(3):377-382. DOI 10.1038/nm.2313.
- Walker F.O. Huntington's Disease. *Lancet*. 2007;369(9557):217-228. DOI 10.1055/s-2007-971176.

Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний

Е.С. Сколотнева , И.Н. Леонова, Е.Ю. Букатич, Е.А. Салина

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

Возбудители листостебельных инфекций мягкой пшеницы *Triticum aestivum* имеют экономическое значение для большинства регионов Российской Федерации. Среди них наиболее распространены различные виды ржавчин и мучнистая роса. Нами усовершенствован методический подход для постулирования эффективности генов, определяющих групповую устойчивость пшеницы к грибным заболеваниям; он объединяет традиционные методы фитопатологической оценки в поле и современные технологии генотипирования с помощью молекулярных ДНК-маркеров. Схема разработанной методики включает следующие этапы: 1) изучение генотипов пшеницы с использованием молекулярных маркеров; 2) оценка генотипов в полевых условиях; 3) сопоставление данных фитопатологической оценки и молекулярного маркирования для выявления образцов пшеницы с эффективной групповой устойчивостью к фитопатогенам. Приведены рекомендации по генотипированию сортообразцов и линий пшеницы с использованием маркеров к генам *Lr16/Sr23*, *Lr24/Sr24*, *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Sr38/Yr17* и гена с плейотропным эффектом *Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)*. Апробированы маркеры для российских сортообразцов и линий, несущих хромосому от *Thinopyrum intermedium* с группой генов *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* и новую транслокацию от *Aegilops speltoides* с группой генов, обозначенных нами *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*. При оценке вклада генов (включая гены, расположенные в районах транслокаций) в формирование устойчивости мягкой пшеницы к грибным инфекциям необходимо использовать расширенную выборку генотипов, в том числе несущих одну и ту же группу генов в различном генетическом окружении. Дополнительно предложены сроки и периодичность учета развития грибных заболеваний в условиях Западной Сибири в зависимости от возбудителя. Предложенный в настоящей статье методический подход может быть использован для идентификации и оценки эффективности групп генов, обеспечивающих защиту пшеницы от листостебельных болезней. Данный подход применим при изучении генетических коллекций, состоящих из изогенных линий, источников и доноров генов устойчивости, а также при отборе генотипов пшеницы с использованием маркер-ориентированной селекции.

Ключевые слова: полевая оценка устойчивости; молекулярные маркеры; групповая устойчивость к грибным заболеваниям; *Lr*; *Sr*; *Pm*; *Triticum aestivum*.

Methodical approaches to identification of effective wheat genes providing broad-spectrum resistance against fungal diseases

E.S. Skolotneva , I.N. Leonova, E.Yu. Bukatich, E.A. Salina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Among the pathogenic complex of the common wheat there is a causal agent of leaf and stem diseases: (rusts and powdery mildew), which has economic importance for most of the Russian regions. We propose a methodological approach for confirmation of effectiveness of wheat genes conferring broad-spectrum resistance to different types of fungal diseases, which integrates traditional field tests and current genotyping techniques with molecular DNA markers. The proposed approach includes the following steps: 1) evaluating of wheat genotypes using molecular DNA markers; 2) field tests for genotypes; 3) confirmation of effectiveness of broad-spectrum resistance genes by matching field scores and data from molecular markers. A protocol has been proposed for genotyping varieties and wheat lines using markers linked to *Lr16/Sr23*, *Lr24/Sr24*, *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Sr38/Yr17* and the gene *Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)* with a pleiotropic effect. Markers to the genes *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* transferred from *Thinopyrum intermedium* into the genomes of Russian wheat varieties and markers to a new translocation from *Aegilops speltoides* with a group of genes, designated as *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*, were tested. When evaluating the contribution of the genes (including genes located on the alien translocations) to the formation of common wheat resistance to fungal diseases, it is necessary to use an extended sample, including genotypes carrying the same group of genes in a different genetic background. In addition, recommendations are given on the terms and frequency of monitoring of fungal diseases in Western Siberia, depending on the pathogen. The methodological approach proposed in the article can be used for identification and evaluation of the efficacy of the genes determining protection of wheat from fungal diseases. This approach is applicable in the investigation of genetic collections consisting of isogenic lines, sources and donors of resistance genes, as well as in the development of wheat genotypes using marker-assisted selection.

Key words: field screening for resistance; molecular markers; broad-spectrum resistance against fungal diseases; *Lr*; *Sr*; *Pm*; *Triticum aestivum*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Сколотнева Е.С., Леонова И.Н., Букатич Е.Ю., Салина Е.А. Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):862-869. DOI 10.18699/VJ17.307

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Skolotneva E.S., Leonova I.N., Bukatich E.Yu., Salina E.A. Methodical approaches to identification of effective wheat genes providing broad-spectrum resistance against fungal diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):862-869. DOI 10.18699/VJ17.307 (in Russian)

В регионах с умеренным климатом, таких как центр и северо-запад России, Урал и Западная Сибирь, постоянным фактором, снижающим урожай зерновых, является комплекс листостебельных патогенов грибного происхождения. Среди них распространены возбудители бурой и стеблевой ржавчины, а также мучнистой росы (Сочалова, Лихенко, 2011; Гуляева и др., 2014).

Бурая ржавчина (возбудитель – биотрофный паразитический гриб *Puccinia triticina*) – одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний пшеницы во всем мире. Интенсивное развитие болезни в разных климатических зонах обусловлено пластичностью и высокой репродуктивной способностью патогена. В Российской Федерации бурая ржавчина встречается повсеместно. Ежегодно она уносит до 10 % урожая, а в годы эпифитотийного развития потери урожая могут достигать 30 % и более (Коваленко и др., 2012). Наибольшее развитие болезни наблюдается в фазу цветения пшеницы, когда рекомендуется проводить серию фитопатологических учетов.

Стеблевая ржавчина (возбудитель – биотрофный паразитический гриб *Puccinia graminis*) на протяжении многих лет не носила эпифитотийного характера развития. Однако в последнее десятилетие заболевание стало приобретать хозяйственное значение в связи со смещением климатических показателей северных регионов в сторону благоприятных условий для развития инфекции. Характерная черта этого вида ржавчины заключается в том, что она может практически полностью уничтожать посевы пшеницы, если поражение наблюдается в ранние фазы развития пшеницы. Особую опасность представляет новая раса стеблевой ржавчины Ug99 и ее модификации, которая после эпифитотии на северо-востоке Африки распространяется по всему миру, в том числе в сторону Российской Федерации.

Мучнистая роса (возбудитель – облигатный узкоспециализированный паразитический гриб *Blumeria graminis*) при массовом развитии вызывает недобор урожая 10–15 % и более (Санин и др., 2002). Одновременное возделывание озимой и яровой пшеницы обеспечивает перезимовку патогена в виде мицелия, что повышает экономическое значение патогена, делая его возбудителем одной из самых опасных болезней злаков.

Основой успешного проведения профилактических и защитных мероприятий от грибных инфекций пшеницы являются как правильная и своевременная их диагностика, так и скрининг устойчивости сортового материала (Санин и др., 2010). Среди методов оценки устойчивости генотипов пшеницы к фитопатогенам наиболее достоверные результаты показывает лабораторный анализ реакций растений на заражение патотипами грибов с известными генами вирулентности (Гешеле, 1978). При этом для анализа инфекционных типов на проростках пшеницы или отрезках листьев используют специальные оценочные шкалы (Койшыбаев и др., 2014), суть большинства которых сводится к присвоению баллов от 0 до 4 различным по качеству типам поражения (где нулю соответствует иммунитет растения). Однако подобная оценка возможна только при наличии коллекции патотипов гриба с известными генами вирулентности. Поэтому в целях

выяснения эффективности генов устойчивости к патогенному комплексу возможно ограничиться полевой оценкой сортового материала, если она организована в регионе статистически, что было обосновано исследованиями ученых из Венгрии, Чехии, Франции и Нидерландов (Mesterhazy et al., 2000). Для массового полевого скрининга устойчивости к видам ржавчины селекционного и коллекционного материала рекомендуются разные шкалы, среди которых наиболее удобна шкала CIMMYT, совмещающая два показателя: тип реакции (качественный) и степень пораженности листьев и стеблей (количественный). Для полевой оценки устойчивости селекционного материала к мучнистой росе пользуются 9-балльной шкалой Мережко, разработанной во Всероссийском НИИ растениеводства (ВИР), присваивающей максимальный балл иммунному растению. Кроме того, существует международная шкала CIMMYT, описывающая степень поражения листьев мучнистой росой в процентах (Койшыбаев и др., 2014).

Визуальный анализ не позволяет корректно провести оценку фенотипа устойчивости в случаях наложения симптомов нескольких листостебельных инфекций. Кроме того, степень проявления генов устойчивости зависит от генетического фона, а также от абиотических факторов и условий внешней среды. Так, например, гены устойчивости к бурой ржавчине *Lr11*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr18* являются температурочувствительными и теряют свою активность при повышении температуры (McIntosh et al., 1995). В этих условиях применение молекулярных маркеров для идентификации генов устойчивости к инфекциям увеличивает эффективность селекции на иммунитет, в частности при создании генотипов с групповой устойчивостью к грибным заболеваниям.

В последнее время разработано много ДНК-маркеров, предлагаемых для диагностики генов устойчивости и использования в схемах маркер-ориентированной селекции зерновых культур MAS (marker-assisted selection) (<http://maswheat.ucdavis.edu/>). Основной принцип MAS заключается в идентификации тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак, и использовании ассоциаций маркер–признак в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий (Леонова, 2013). Однако прежде ассортимент разработанных молекулярных маркеров должен проходить верификацию на разном генетическом фоне, включая генетические коллекции изогенных линий, содержащих гены устойчивости. Рекомендованными для дальнейшего использования в MAS могут быть только маркеры, для которых случаи ложного положительного или отрицательного результата исключены. Именно по этой причине настоящий этап развития MAS характеризуется как повсеместная апробация ДНК-маркеров на разном сортовом материале с выявлением универсальных систем идентификации генов, в том числе генов устойчивости к инфекциям. Групповая устойчивость может обеспечиваться генными локусами, имеющими плейотропный эффект, которые обуславливают частичную устойчивость к бурой, стеблевой и желтой ржавчине и мучнистой росе: *Lr46* (=Yr29/Sr58/Pm39), *Lr67* (=Yr46/Sr55/Pm46) и *Lr34* (=Sr57/Yr18/Pm38) (Krattinger et al., 2016). В ряде случаев групповая устойчивость обе-

спечивается генами, которые расположены в чужеродных транслокациях, в связи с чем чаще всего наследуются единой группой. При этом отдельные гены в группе могут быть не эффективны в регионе из-за специфической структуры патогенного комплекса, что важно учитывать при введении данной транслокации в селекционный материал. Так, эффективность транслокации *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* в большинстве регионов Российской Федерации наблюдается по отношению к стеблевой ржавчине, а в ряде регионов – и к мучнистой росе (Сочалова, Лихенко, 2011; Гулятьева и др., 2015). Хорошим примером транслокации, в большинстве регионов эффективно защищающей пшеницу страны от бурой и стеблевой ржавчины, является группа сцепления *Lr19/Sr25*, однако исключением служит регион Поволжья, где в популяции *P. trititica* выявлена высокая частота патотипов, вирулентных к *Lr19* (Гулятьева и др., 2015).

Нами разработан методический подход для постулирования эффективности комплекса генов, тесно сцепленных между собой и отвечающих за устойчивость к разным фитопатогенам, в коллекциях гибридов и сортообразцов пшеницы. Под эффективностью таких групп генов или генных локусов понимается их способность обеспечивать защиту растения от нескольких грибных возбудителей. Как правило, при этом подразумевается определенный географический ареал со специфическим для него вирулентным составом патогенных популяций.

В настоящее время в зарубежных и отечественных коллекциях озимой и яровой пшеницы распространены гибридные линии и сортообразцы пшеницы, имеющие группы сцепления *Lr16/Sr23*, *Lr24/Sr24*, *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Sr38/Yr17* и ген с плейотропным эффектом *Lr34* (= *Sr57/Yr18/Pm38*) (Белан и др., 2012; Dakouri et al., 2013; Садовая и др., 2014; Shamanin et al., 2016). Кроме того, в последние годы установлено, что в России широкое распространение получили сорта, несущие практически интактную хромосому от пырея с группой генов *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*, как, например, у сортов Тулайковская 5, 10, 100 (Salina et al., 2015). Новая транслокация от *Aegilops speltoides* с группой генов, обозначенных нами как *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*, недавно описана в коллекционном материале Института цитологии и генетики СО РАН (Petrash et al., 2016).

Процедура поддержания любой коллекции путем размножения семенного материала влечет за собой необходимость проверки генетической чистоты изучаемых образцов. Предложенный нами методический подход позволяет провести верификацию коллекций гибридов и сортообразцов пшеницы на присутствие восьми тесно сцепленных групп генов: *Lr16/Sr23*, *Lr24/Sr24*, *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Sr38/Yr17*, *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*, *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7* и гена с плейотропным эффектом *Lr34* (= *Sr57/Yr18/Pm38*), определяющих групповую устойчивость к фитопатогенам.

В методику входит: 1) изучение генотипов пшеницы с использованием молекулярных маркеров; 2) оценка генотипов в полевых условиях; 3) сопоставление данных фитопатологической оценки и молекулярного маркирования для выявления образцов пшеницы с эффективной групповой устойчивостью к фитопатогенам.

Изучение генотипов пшеницы с использованием молекулярных маркеров

К настоящему времени в научной литературе предложен широкий выбор молекулярных маркеров генов устойчивости к грибным заболеваниям, в том числе и чужеродных транслокаций, несущих комплекс генов, тесно сцепленных друг с другом, и генов с плейотропным эффектом. Каждый из этих генов обуславливает устойчивость к определенному виду патогена. В случае эффективной устойчивости ко всем патогенам наблюдается фенотипическое проявление группового иммунитета у изучаемых образцов пшеницы. В нашем исследовании проведена процедура верификации маркеров, позволяющих выявить группу генов к разным фитопатогенам, и оптимизирован протокол их использования в маркер-ориентированной селекции на групповой иммунитет. Верификацию маркеров проводили на коллекциях яровой мягкой пшеницы Всероссийского НИИ фитопатологии (ВНИИФ), Омского государственного аграрного университета (ОмГАУ) и Сибирского НИИ растениеводства и селекции – филиала ИЦиГ СО РАН (СибНИИРС). В качестве положительного контроля на присутствие генов устойчивости к грибным заболеваниям использовали международные наборы почти изогенных линий пшеницы, созданных на сортах Тэтчер (Long, Kolmer, 1989) и Маркиз (Roelfs, Martens, 1988). В целях облегчения процедуры генотипирования образцов оптимизирована реакционная смесь для проведения анализа ПЦР.

Пробоподготовка и оборудование

Для экстракции ДНК используют 5–7-дневные проростки или растения пшеницы, выращенные в поле или теплице, при этом берут фрагмент листа одного растения, длиной не более 25 мм. Для оценки необходим анализ не менее пяти растений каждого изучаемого образца, на первом этапе анализа ПЦР допустимо объединение аликвот. Фрагмент листа хранят при температуре от 0 до +5 °C, если выделение ДНК планируется в этот же день, или в условиях от –20 до –70 °C, если выделение ДНК планируется позже. Для охлаждения или хранения собранный материал помещают в пластиковые пробирки или упаковки.

Необходимым оборудованием для экстракции ДНК, постановки ПЦР и визуализации ее результата являются: микроцентрифуга для пробирок типа Эппендорф до 16000 g, термостат или водяная баня, набор дозаторов переменного объема (диапазон 0.5 – 1000 мкл), вортекс-шейкер для перемешивания микропробирок типа Эппендорф объемом 0.2 – 1.5 мл, амплификатор, горизонтальная камера для электрофореза, источник тока и система гель-документирования.

Последовательность анализа

Качество результатов генотипирования зависит, в первую очередь, от правильно подобранного молекулярного маркера к тестируемому гену и достигается при оптимизировании смеси для ПЦР, режима амплификации и системы визуализации продуктов ПЦР. Немаловажен и выбор метода выделения ДНК из растительных образцов.

Этап 1. Экстракция ДНК. Методики выделения ДНК из растительных образцов, которые используют в раз-

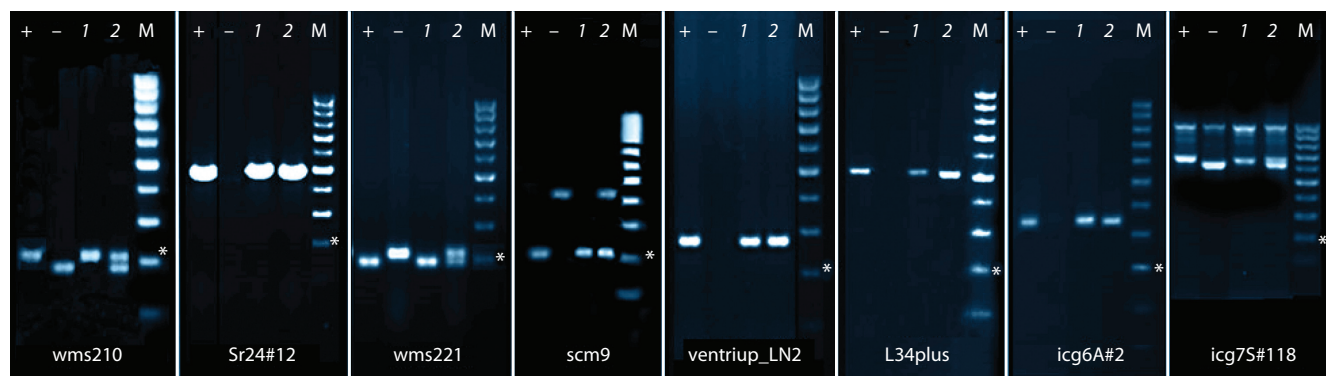


Fig. 1. Electrophoretic images for markers for group resistance genes *Lr16/Sr23* (wms 210), *Lr24/Sr24* (Sr24#12), *Lr19/Sr25* (wms221), *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* (scm9, fragment 207 bp), *Lr37/Sr38/Yr17* (ventriup_LN2), *Lr34(Sr57/Yr18/Pm38)* (L34 plus), *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* (icg6A#2), *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7* (icg7S#118).

(+) Wheat accession carrying the group of resistance genes under study (*r* allele) as a positive control, see Supplement, Table 4. (–) Negative control (Thatcher or Chernyava 13 cvs.; *s* allele). 1, Wheat line homozygous for the *r* allele; 2, heterozygous wheat line with the *r* and *s* alleles; M, 100-bp molecular weight ladder. The asterisk indicates the 200-bp rung.

личных лабораториях, имеют общий принцип: лизис клеточной стенки, дезактивация эндонуклеаз, очистка от белковой фракции и преципитация молекулы ДНК. Распространенным действующим реагентом буфера, лизирующего растительную клеточную стенку, является ЦТАБ – СТАВ-модифицированный метод ДНК экстракции, который подробно описан в работе (Stepien et al., 2003). По результатам сравнения качественных и количественных характеристик ДНК, мы предлагаем для подготовки растительных образцов при маркерном анализе использовать альтернативную систему лизирующего буфера на основе додецилсульфата натрия (SDS), в состав которого также включен пиросульфит натрия, замедляющий реакции окисления (Plaschke et al., 1995). Основные компоненты буфера, оптимизированные в процессе работы, приведены в Доп. материалах 1¹. В результате удается получить препараты ДНК приемлемого качества (соотношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм не менее 1.8) и в количестве, необходимом для генотипирования (1–5 мкг).

Этап 2. Амплификация и визуализация продуктов ПЦР. Состав реакционной смеси для ПЦР, как правило, содержит следующие компоненты: прямой и обратный праймеры, олигонуклеотиды, Taq-полимеразу, буфер с ионами Mg^{2+} и воду mQ. Разработчики маркеров обычно указывают концентрации праймеров на объем смеси, необходимые для качественной ПЦР-амплификации маркера. Однако для упрощения лабораторной работы по тестированию генетического материала с использованием широкого набора маркеров удобнее использовать универсальную пропись. Реакционная смесь оптимизирована нами для амплификации большинства известных молекулярных маркеров (Доп. материалы 2). Нами также апробирована коммерческая ПЦР-смесь БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (ООО «Биолабмикс»), которая позволяет сократить число шагов пипетирования, так как содержит олигонуклеотиды, Taq-полимеразу и буфер. Кроме того, добавленные в ПЦР-смесь красители (ксилан

цианол, бромфеноловый синий, Orange G, тартразин) не влияют на работу Taq-полимеразы и позволяют наносить продукты амплификации сразу на гель (Доп. материалы 3).

Условия проведения ПЦР-амплификации оптимизированы нами для каждого молекулярного маркера на широкой выборке генотипов. Праймеры представляют собой олигонуклеотиды, синтезированные фирмой ООО «БИОССЕТ». Их последовательности представлены в литературе, за исключением праймеров для маркеров Xicg6A#2 и Xicg7S#118, разработанных в ИЦиГ СО РАН для идентификации группы генов *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* и *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*, охарактеризованных ранее (Доп. материалы 4) (Salina et al., 2015; Petrash et al., 2016). В Доп. материалах 4 приведена информация о некоторых сортах, которые, по результатам проведенной нами идентификации, могут быть рекомендованы для использования в качестве положительных контролей изучаемой группы генов. Функцию отрицательного контроля может выполнять универсально восприимчивый сорт или сортообразец, не несущий изучаемого гена. Подобранные условия, обеспечивающие эффективную амплификацию молекулярных маркеров, которые представлены в Доп. материалах 5. Альтернативные маркеры, используемые для идентификации указанных выше групп генов, и их верификация в отечественных лабораториях приведены в Доп. материалах 4.

Этап 3. Документирование и анализ результатов. Электрофорез продуктов ПЦР проводится согласно условиям, представленным в Доп. материалах 5. В процессе приготовления агарозного геля на 100 мл расплавленной агарозы добавляется 5 мкл 1 % раствора этидия бромид для последующей визуализации фрагментов ДНК в УФ-свете. В Доп. материалах 6 и на рис. 1 приведена длина фрагментов ПЦР, маркирующих доминантные аллели изучаемых групп генов устойчивости. Кодоминантный маркер позволяет выявить гетерозиготное состояние генов, которое будет определяться парой фрагментов различного молекулярного веса: *r*-аллель (resistant) и *s*-аллель (susceptible) гена устойчивости. Фрагменты ПЦР, отлич-

¹ Дополнительные материалы 1–12 см. в Приложении по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx10.pdf>

ные по длине от указанных в Доп. материалах 6 и присутствующие у отрицательного контроля, не рассматриваются при постулировании группы генов. Например, при оценке группы генов *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7* с использованием маркера *Xicg7S#118* рассматривается фрагмент длиной около 680 п. н., соответствующий г-аллелю, и фрагмент 630 п. н. (s-аллель) (см. Доп. материалы 6). Фрагмент ПЦР длиной 1000 п. н. (см. рис. 1, *icg7S#118*) исключается из анализа, так как не соответствует описанным выше требованиям. Также следует обращать внимание на то, что один и тот же маркер может идентифицировать различные группы генов, как в случае маркера *scm9*, выявляющего различные ржаные транслокации – 1RS.1BL (длина фрагмента 207 п. н.) и 1RS.1AL (длина фрагмента 228 п. н.). В этом случае, если происхождение транслокации неизвестно, следует использовать гели с более высокой разрешающей способностью, чем приведено в Доп. материалах 5.

Оценка устойчивости генотипов пшеницы в полевых условиях к комплексу грибных заболеваний

Для проведения полевой оценки и отбора генотипов пшеницы с устойчивостью к комплексу грибных патогенов необходимо выполнение следующих условий.

1. Достоверность результатов обеспечивается высевом сортообразцов в нескольких повторностях на естественном инфекционном фоне при соблюдении дистанции между опытами от 1.5 км.
2. Проверка генов устойчивости у разных генотипов позволяет обнаружить вклад генотипической среды в реакцию на заражение.
3. В оценку обязательно должны включаться восприимчивые контроли к инфекциям. Для большинства регионов страны показательную восприимчивость к комплексу грибных заболеваний проявляют сорта яровой пшеницы Черныява 13, Скала, Хакасская. Кроме того, в оценку включают сорта, на основе которых созданы линии.
4. Сроки учета и их периодичности должны устанавливаться в зависимости от региона и возбудителя. Для листостебельных патогенов это период, определяемый развитием флаг-листа и фазами зрелости зерна в колосе. По результатам многолетних наблюдений за развитием фитопатогенного комплекса грибных заболеваний на посевах пшеницы в Западной Сибири, мы рекомендуем схему, представленную на рис. 2. Сроки маршрутных обследований в Центральном регионе России из рекомендаций по проведению фитосанитарного мониторинга, составленных в ВНИИФ, приведены в Доп. материалах 7.
5. Желательным является соблюдение унифицированного подхода к скринингу устойчивости сортообразцов к комплексу патогенов на базе стандартных шкал для оценки грибных инфекций. В частности, для удобства обработки результатов полевого обследования мы предлагаем в качестве эффективных в регионе условно рассматривать те группы сцепления, которые обеспечивали устойчивость ко всем соответствующим возбудителям инфекций на естественном инфекционном фоне. То есть, например, после заключения о групповой устойчи-

вости генотипов с транслокацией *Lr24/Sr24* как к бурой, так и к стеблевой ржавчине, она может рассматриваться как эффективная в регионе.

Вывод об эффективности транслокации *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* будет сделан после описания устойчивости генотипов к ржавчинным заболеваниям и мучнистой росе. При этом мы предлагаем оперировать только двумя показателями: эффективностью («1») и неэффективностью («0») гена/группы генов, что позволит получить наиболее строгую оценку заявленных групп генов, в соответствии с целью, поставленной при разработке данного методического подхода. В табл. 1 приведены соответствия предлагаемых нами условных обозначений и наиболее распространенных оценочных шкал. Описание различных оценочных шкал и соответствующие иллюстрации типов поражения пшеницы ржавчинными грибами и мучнистой росой для удобства использования собраны в Доп. материалах 8–11.

Постулирование эффективной устойчивости к грибным заболеваниям в селекционном материале

В соответствии с предложенным методическим подходом эффективность гена или группы генов в генотипе выявляют путем сопоставления данных полевой оценки устойчивости и молекулярного маркирования. Совпадение условного обозначения эффективности «1» и положительного сигнала молекулярного маркера мы предлагаем рассматривать как основание для постулирования эффективности гена/группы сцепления. Рассмотрим пример применения процедур предложенного методического подхода для постулирования эффективных генов к разным болезням в материале сибирской коллекции мягкой яровой пшеницы, являющейся собственностью генофонда растительных ресурсов СибНИИРС. По данным ПЦР-анализа генотипирования, селекционный материал защищен генами, определяющими устойчивость к ржавчинным болезням и мучнистой росе (*Lr19/Sr25*; *Lr24/Sr24*; *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*; *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*; *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*), и плеiotропным геном *Lr34*(=*Sr57/Yr18/Pm38*). Полевая оценка изученной коллекции пшеницы на устойчивость к комплексу грибных заболеваний выполнена согласно нашим рекомендациям. Расположение полей и наличие инфекционного участка в СибНИИРС позволили выполнить достоверную оценку вариантов опыта в условиях естественного инфекционного фона в трех повторностях (I, II, III) во время летнего периода вегетации в 2016 г. Результаты приведены в Доп. материалах 12. Устойчивость генотипов оценивали с помощью шкал ВИР и СИММУТ, после чего генам и группам сцепления были присвоены условные обозначения их эффективности по табл. 1.

На заключительном этапе проведено сопоставление результатов данных полевой оценки устойчивости и молекулярного маркирования генов устойчивости к стеблевой, бурой ржавчине, мучнистой росе. Совпадение условного обозначения эффективности «1» и положительного сигнала соответствующего молекулярного маркера рассматривалось как основание для постулирования эффективности гена или группы сцепления, определяющей групповую устойчивость генотипа. Случаи, когда линия или сорт

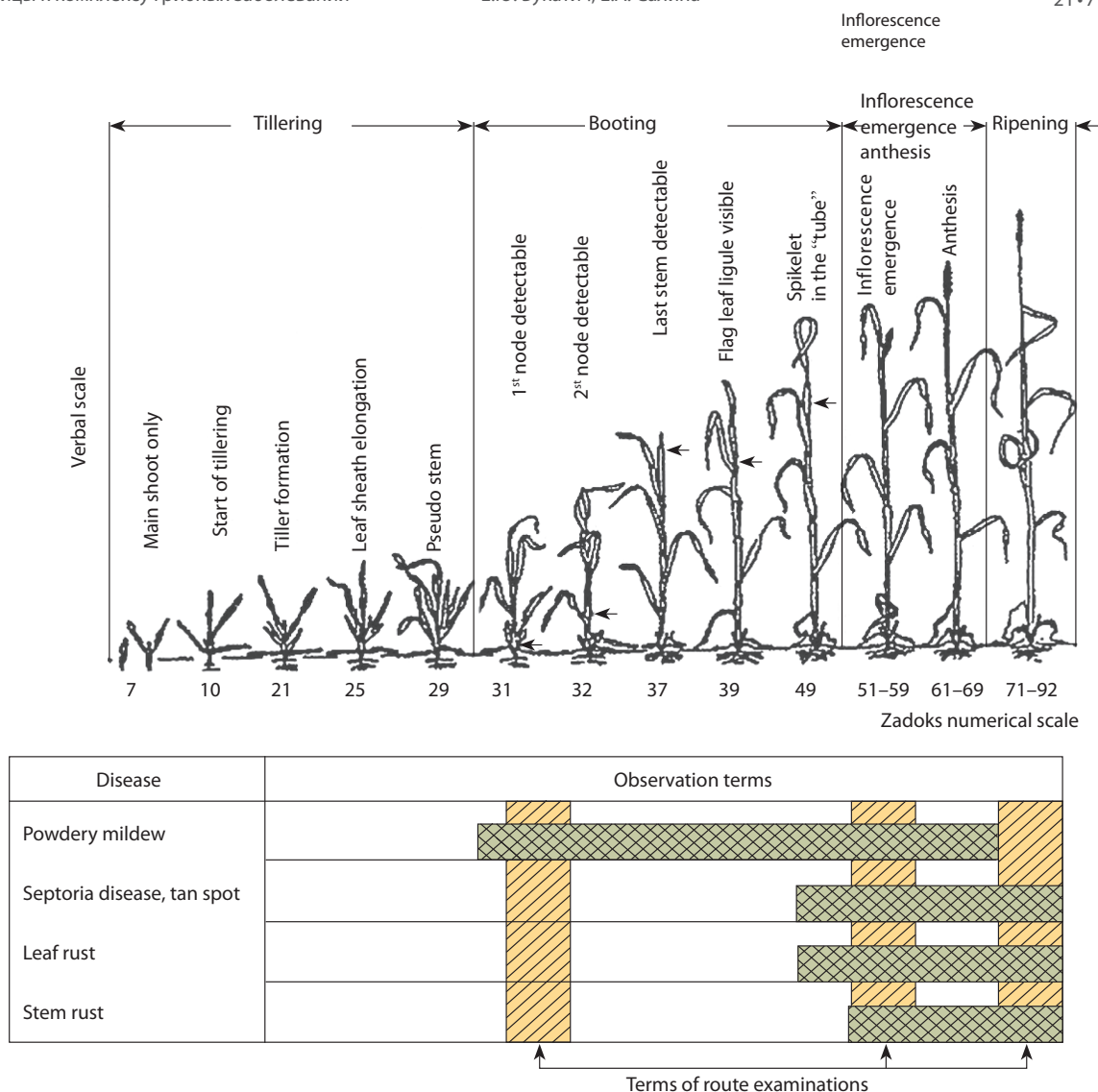


Fig. 2. Conformity of wheat plant developmental stages and the terms of tests for foliar diseases in West Siberia. The international Zadoks wheat growth staging scale is presented as in (Sanin et al., 2010).

Table 1. Matching of the proposed conventional indices of the efficiency of genes/linkage groups for rusts and powdery mildew and the commonly recognized scales for assessment of the resistance of wheat genotypes

Proposed designations	Rusts		Powdery mildew	
	After Stakman et al., 1962	According to the CIMMYT scale	After Merezko, 1999	According to the CIMMYT scale
Inefficiency 0	3–4, X+	90S-MS, 40-60MR, TS	1, 3, 5	20–80 %
Efficiency 1	1–2	30MR-5R, TR, 0	7, 9	10 %

проявляли высокий уровень устойчивости к нескольким заболеваниям, при этом положительного сигнала ни с одним из маркеров к изучаемым генам не было выявлено, являются основанием для дальнейшего поиска в данном образце других эффективных генов.

В результате оценки устойчивости генотипов пшеницы в условиях фитопатогенного комплекса лесостепи Приобья Новосибирской области выявлена эффективность групп генов *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Pm8*, *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*, *Lr7Asp/Sr7Asp/Pm7Asp*. Неэффективными являются гены *Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)*, *Lr16/Sr23*, *Lr37/Sr38*, что показывает сопоставление данных полевого об-

следования большинства генотипов, несущих изучаемые гены (табл. 2).

Мы предполагаем для сорта Экада 85 наличие других генов устойчивости к ржавчинным болезням и мучнистой росе, которые подлежат выяснению.

Селекция на иммунитет – сложная проблема не только в России, но и в других странах мира, так как вновь создаваемые сорта быстро теряют устойчивость вследствие появления новых вирулентных рас патогена. В связи с этим приобретают экономическое значение создание сортов с длительной устойчивостью, а также пирамидирование нескольких генов устойчивости к комплексу патогенов в

Table 2. Efficiency of genes for leaf disease resistance in spring common wheat accessions in the Novosibirsk region

Cultivar/line	Identified group of genes	Designation of efficiency against			Molecular marker-based detection	Postulation of the efficiency of the gene/linkage group
		brown rust	leaf rust	powdery mildew		
Chernyava 13	Susceptible control	0	0	0		
Lutestsens 54-04-17	<i>Lr19/Sr25</i>	1	1		+	+
Lutestsens 220-03-45	<i>Lr19/Sr25</i>	1	1		+	+
Estivum 851	<i>Lr19/Sr25</i>	1	1		+	+
Lutestsens 307-97-7	<i>Lr26/Sr31/Pm8</i>	1	1	1	+	+
Lutestsens 363-96-4	<i>Lr26/Sr31/Pm8</i>	1	1	1	+	+
Lutestsens 532-00-13	<i>Lr26/Sr31/Pm8</i>	1	1	1	+	+
Sr24(Agent)9*LMPG	<i>Lr24/Sr24</i>	1	1		+	+
Line <i>TcLr16</i>	<i>Lr16/Sr23</i>	0	0	–	+	–
Line <i>TcLr37</i>	<i>Lr37/Sr38</i>	0	0	–	+	–
Ekada 146	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	0	0	0	+	–
Ekada 121	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	0	0	0	+	–
FKP 109/7	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	0	0	0	+	–
Ekada 85	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	1	1	1	+	*
Fiton 41	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	0	0	0	+	–
Tulaikovskaya 10	<i>Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2</i>	1	1	1	+	+
Tulaikovskaya zolotistaya	<i>Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2</i>	1	1	1	+	+
11-8	<i>LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7</i>	1	1	1	+	+

* The decision on the *Lr34/Sr57/Pm38* gene in Ekada 85 is substantiated in the body text.

одном генотипе. Удовлетворительный результат отбора исходного материала для селекции на иммунитет возможно получить только путем совмещения классических и современных методов селекции. Маркер-ориентированная селекция уже зарекомендовала себя как гарантированно быстрый подход создания новых линий и сортов пшеницы (Салина, 2016). Маркерный анализ является обязательной процедурой изложенного в статье методического подхода, в связи с чем постулирование эффективности генов устойчивости в сортах и линиях пшеницы становится возможным при значительной экономии времени и ресурсов. Форма модифицированной нами ПЦР-системы экономит время пробоподготовки и снижает вероятность контаминации за счет минимизированного числа шагов пипетирования, поэтому доступна даже для неспециализированных генетических лабораторий. Представленный в настоящей статье методический подход может быть использован для идентификации тесно сцепленных групп генов, обеспечивающих устойчивость к нескольким видам патогена с целью верификации коллекций пшеницы, а также проведения маркер-ориентированной селекции.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project 14.604.21.0106 of July 7, 2014, unique identifier RFMEFI60414.

The authors are grateful to E.I. Gul'tyaeva for valuable discussion of the proposed approaches, to Prof. McCallum (Canada), Prof. Boerner (Germany), and CIMMYT (Mexico) for providing isogenic lines.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Belan I.A., Rosseeva L.P., Rosseev V.M., Badaeva E.D., Zelenskiy Y.I., Blokhina N.P., Shepelev S.S., Pershina L.A. Examination of adaptive and agronomic characters in lines of common wheat Omskaya 37 bearing translocations 1RS.1BL and 7DL-7Ai. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(1):178-186. (in Russian)

Dakouri A., McCallum B.D., Radovanovic N., Cloutier S. Molecular and phenotypic characterization of seedling and adult plant leaf rust resistance in a world wheat collection. *Mol. Breed.* 2013;32(3): 663-677.

Davoyan E.R., Bespalova L.A., Davoyan R.O., Zubanova Yu.S., Mikov D.S., Filobok V.A., Khudokormova J.N. Use of molecular markers in wheat breeding for resistance to leaf rust at the Lukyanenko Research Institute of Agriculture. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014; 18(4/1):732-738. (in Russian)

Geshele E.E. *Osnovy fitopatologicheskoy otsenki v seleksii rasteniy* [Fundamentals of Phytopathological Evaluation in Plant Breeding]. Moscow, 1978. (in Russian)

- Gulyaeva E.I., Sadovaya A.S., Shaidayuk E.L. Molecular screening of new Russian common wheat cultivars for resistance to leaf rust. *Vestnik zashchity rasteniy* = Plant Protection News. 2014;1:26-29 (in Russian)
- Gulyaeva E.I., Shaidayuk E.L., Kazartsev I.A., Aristova M.K. Structure of the Russian populations of *Puccinia triticina* Eriks. *Vestnik zashchity rasteniy* = Plant Protection News. 2015;3(85):5-10. (in Russian)
- Gupta S.K., Charpe A., Prabhu K.W., Haque O.M.R. Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113:1027-1036.
- Helguera M., Khan I.A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhong-Qi L., Dubcovsky J. PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci.* 2003;43:1839-1847.
- Kassa M.T., You F.M., Hiebert C.W., Pozniak C.J., Fobert P.R., Sharpe A.G., Menzies J.G., Humphreys D.G., Rezac H.R., Fellers J.P., McCallum B.D., McCartney C.A. Highly predictive SNP markers for efficient selection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr16*. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):45.
- Kovalenko E.D., Kolomiets T.M., Kiseleva M.I., Zhemchuzhina A.I., Smirnova L.A., Shcherbik A.A. Metody otsenki i otbora iskhodnogo materiala pri sozdaniy sortov pshenitsy ustoychivyykh k buroy rzhavchine. *Metodicheskie rekomendatsii VNIIF* [Methods for evaluation and selection of the source material for development of wheat varieties with resistance to leaf rust. Methodical recommendations of the All-Russia Research Institute of Plant Pathology]. Moscow, 2012. (in Russian)
- Koishybaev M., Shamanin V.P., Morgunov A.I. Skrining pshenitsy na ustoychivost k osnovnym boleznyam: metodicheskie ukazaniya. [Screening of Wheat for Resistance to Major Diseases: Guidelines]. Ankara, 2014. (in Russian)
- Krattinger S.G., Sucher J., Selter L.L., Chauhan H., Zhou B., Tang M., Upadhyaya N.M., Mieulet D., Guiderdoni E., Weidenbach D., Schaffrath U., Lagudah E.S., Keller B. The wheat durable, multipathogen resistance gene *Lr34* confers partial blast resistance in rice. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14:1261-1268.
- Lagudah E.S., Krattinger S.G., Herrera-Foessel S., Singh R.P., Huerta-Espino J., Spielmeier W., Brown-Guedira G., Selter L.L., Keller B. Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(5):889-898.
- Leonova I.N. Molecular markers: implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekttsii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(2):314-325. (in Russian)
- Long D.L., Kolmer J.A. A North American system nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology.* 1989;79:525-529.
- Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S., Spielmeier W., Lawrence G.J., Pryor A.J., Ellis J.G. Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance gene *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:496-504.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rust: an Atlas of Resistance Genes. Australia. Melbourne: CSIRO Publishing, 1995.
- Merezhko A.F. Popolnenie, sokhranenie v zhivom vide i izuchenie mirovoy kollektsii pshenitsy, egilopsa i tritikale (metodicheskie ukazaniya). [Development, preservation in a living form, and study of the world collection of wheat, Aegilops, and triticale: methodical instructions]. Saint-Petersburg: VIR Publ., 1999 (in Russian)
- Mesterházy A., Bartoš P., Goyeau H., Niks R., Csösz M. European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie.* 2000;20(7):793-804.
- Petrash N.V., Leonova I.N., Adonina I.G., Salina E.A. Effect of translocations from *Aegilops speltoides* Tausch. on resistance to fungal diseases and productivity in common wheat. *Rus. J. Genet.* 2016;52(12):1253-1262.
- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91:1001-1007.
- Prabhu K.V., Gupta S.K., Charpe A., Koul S. SCAR marker tagged to the alien leaf rust resistance gene *Lr19* uniquely marking the *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr24* in wheat: a revision. *Plant Breeding.* 2004;123:417-420.
- Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F., Snape J.W., Köbner R.M.D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103:618-624.
- Roelfs A.P., Martens J.W. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology.* 1988;78:526-531.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998;149:2007-2023.
- Sadovaya A.S., Gulyaeva E.I., Mitrofanova O.P., Shaidayuk E.L., Hakimova A.G., Zuev E.V. Leaf rust resistance in common wheat varieties and lines from the collection of the Vavilov Plant Industry Institute carrying alien genetic material. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekttsii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(4/1):739-750. (in Russian)
- Salina E.A. Genome modeling and editing technologies for meeting breeding challenges. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* = Achievements of Science and Technology of AIC. 2016;30(9):9-14 (in Russian)
- Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Yu., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat Thi Mai L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. *Euphytica.* 2015;204:91-101.
- Salina E.A., Leonova I.N., Shcherban A.B., Stasyuk A.I. Spособ sozdaniya liniy ozimoy myagkoy pshenitsy s kompleksnoy ustoychivost'yu k buroy i steblevoy rzhavchine i muchnistoy rose [A method of the development of common wheat winter lines with complex resistance to leaf and stem rusts and to powdery mildew]. Patent RF no. 2598275, 2016. (in Russian)
- Sanin S.S., Cherkashin V.I., Nazarova L.N. Fitosanitarnaya ekspertiza zernovykh kultur (bolezni rasteniy): rekomendatsii. [Phytosanitary examination of cereals (plant diseases): recommendations]. Moscow, 2002. (in Russian)
- Sanin S.S., Sokolova E.A., Cherkashin V.I., Nazarova V.I., Strizhekozin Yu.A., Ibragimov T.Z. Bolezni zernovykh kolosovykh kultur (rekomendatsii po provedeniyu fitosanitarnogo monitoringa) [Diseases of cereal crops: recommendations for phytosanitary monitoring]. Moscow, 2010. (in Russian)
- Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenskiy Y., Olivera P., Morgounov A. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. *Euphytica.* 2016;212(2):287-296.
- Sochalova L.P., Likhenko I.E. Study of the resistance of wheat to foliar pathogens in Western Siberia. *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki* = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 2011;1:18-25 (in Russian)
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegerin W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. U.S.D.A. Agric. Res. Serv. No. E 617 (Rev.), 1962.
- Stepien L., Golka L., Chelkowski J. Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources. *J. Appl. Genet.* 2003;44(2):139-149.
- Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R.N., Rudd J.C. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. *Plant Breeding.* 2007;26:482-486.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Scopus, Zoological Record (Web of Science), Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 27.11.2017. Выход в свет 08.12.2017. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 13,95.

Уч.-изд. л. 16,10. Тираж 200 экз. Заказ № 258. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.