

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Founded in 1997

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

«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”.

«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 (редакция от 25.05.2015 г.: <http://vak.ed.gov.ru/87>), Российский индекс научного цитирования, базу данных Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Электронная версия журнала размещена 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».

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 (Россия)

Заместители главного редактора

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

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

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук (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* – чл.-кор. 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* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амтиславская – 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* – чл.-кор. РАМН, 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* – д-р биол. наук, доцент (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* – 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* – д-р хим. наук, доцент (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* – д-р биол. наук, проф. (Россия)

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090. Секретарь по организационным вопросам: С.В. Зубова, тел.: (383) 3634977. Тел. редакции: (383)3634963*5204. Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г. При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна. Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич. Компьютерная графика и верстка: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина. Фотография на обложке: В.С. Коваль. Подписано в печать 16.09.2015 г. Формат бумаги 60 × 84¹/₈. Уч.-изд. л. 23,8. Усл.-печ. л. 17,0. Тираж 200 экз. Заказ № 214.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

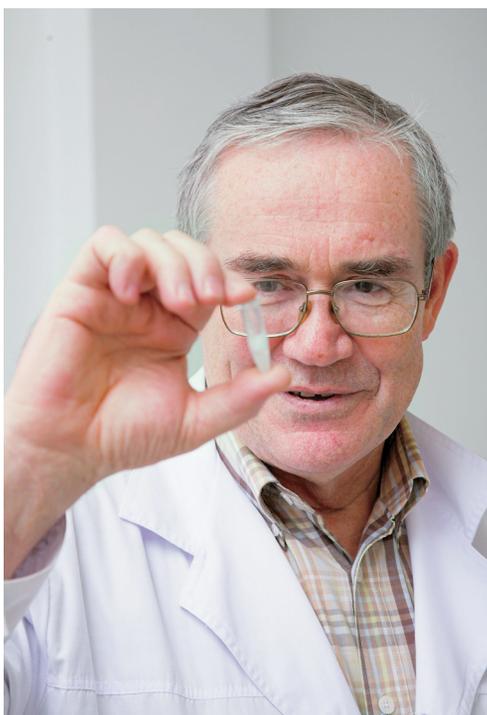
Криоархивирование и репродуктивные технологии	404	Репродуктивные эффекты нокаута гена фактора некроза опухолей (<i>TNF</i>) у мышей <i>С.О. Масленникова, Г.В. Концевая, М.А. Золотых, М.В. Анисимова, Н.А. Феофанова, М.П. Мошкин, С.А. Недоспасов, Л.А. Герлинская</i>
367		Применение репродуктивных технологий и создание криобанка генетических ресурсов лабораторных животных <i>С.Я. Амстиславский, Е.Ю. Брусенцев, Т.О. Абрамова, Д.С. Рагаева, И.Н. Рожкова, Т.Н. Игонина, Е.А. Кизилова, В.А. Напримеров, Н.Ю. Феоктистова</i>
372	410	Эффекты воздействия факторов роста при культивировании <i>in vitro</i> эмбрионов мышей и крыс <i>Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина, И.Н. Рожкова, Д.С. Рагаева, С.Я. Амстиславский</i>
378	413	Сравнение различных сочетаний криопротекторов и методов оттаивания при криоконсервации эмбрионов мышей и крыс <i>Т.Н. Игонина, Е.Ю. Брусенцев, И.Н. Рожкова, В.А. Напримеров, С.Я. Амстиславский</i>
383	420	Эффекты репродуктивных технологий и SPF-статуса на некоторые физиологические и поведенческие характеристики крыс с артериальной гипертензией (линия НИСАГ) <i>Д.С. Рагаева, Т.О. Абрамова, И.Н. Рожкова, Е.Ю. Брусенцев, Е.В. Калинин, Т.Н. Игонина, С.Я. Амстиславский</i>
Высокотехнологическое фенотипирование	427	Метаболиты мозга у крыс линий НИСАГ и Вистар <i>О.Б. Шевелев, А.А. Серяпина, А.Л. Маркель, М.П. Мошкин</i>
388	432	Проведение и автоматизация теста «водный лабиринт Морриса» в условиях SPF-вивария <i>Н.В. Хоцкин, В.А. Куликов, Е.Л. Завьялов, Д.В. Фурсенко, А.В. Куликов</i>
394	439	Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли <i>Д.В. Фурсенко, Н.В. Хоцкин, В.А. Куликов, А.В. Куликов</i>
399	445	Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом гена <i>Kaiso</i> <i>В.С. Коростина, А.В. Куликов</i>
		Магнитно-резонансная спектроскопия нейрометаболитов в гиппокампе у агрессивных и ручных самцов крыс <i>Р.Г. Гулевич, А.Е. Акулов, С.Г. Шихевич, Р.В. Кожемякина, И.З. Плюснина</i>
		Межлинейные различия мышей по температурной реакции на интраназальное введение наночастиц оксида платины <i>Д.В. Петровский, А.В. Ромащенко, С.Ю. Троицкий, М.П. Мошкин</i>
		Изменения транскриптома префронтальной коры мозга при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS <i>Н.А. Стефанова, Е.Е. Корболина, Н.И. Ершов, Е.И. Розаев, Н.Г. Колосова</i>

Моделирование патологий и экспериментальная терапия

- 455 Стресс и артериальная гипертония: крысы линии НИСАГ (ISIAN)
Е.В. Антонов, Ю.В. Александрович, А.А. Серяпина, Л.О. Климов, А.Л. Маркель
- 460 *In vivo* МРТ-визуализация динамики развития глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID
Е.Л. Завьялов, И.А. Разумов, Л.А. Герлинская, А.В. Ромащенко
- 466 Морфофункциональные и биохимические показатели у золотистых хомячков при развитии холангиокарциномы, ассоциированной с описторхозом
Г.А. Максимова, М.Ю. Пахарукова, Е.В. Кашина, Н.А. Жукова, М.Н. Львова, М.В. Хвостов, Д.С. Баев, А.В. Катохин, Т.Г. Толстикова, В.А. Мордвинов
- 474 Корреляция чувствительности к гепатоканцерогенезу, индуцированному введением орто-аминоазотолуола, со степенью активации сигнальных путей Ahg и Car у мышей
Н.В. Багинская, Е.В. Кашина, М.Ю. Шаманина, С.И. Ильницкая, В.И. Каледин, В.А. Мордвинов
- 480 Модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 на мышах линии nude для исследования онколитической активности вируса осповакцины
Г.В. Кочнева, А.А. Гражданцева, Г.Ф. Сиволобова, А.В. Ткачева, А.Н. Швалов, А.Ю. Юнусова, Е.И. Рябчикова, С.В. Нетесов
- 487 Мышь линии SCID как модельное животное для оценки эффективности препаратов против натуральной оспы
К.А. Титова, Ал.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев, Ар.А. Сергеев, Д.О. Горбатовская, А.С. Замедьянская, Л.Н. Шишкина, О.С. Таранов, В.В. Омигов, Е.Л. Завьялов, А.П. Агафонов, А.Н. Сергеев
- 494 Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter spp.* у лабораторных мышей
Е.А. Литвинова, М.Д. Беляев, А.В. Прохорчук, В.С. Коростина, Е.Б. Прохорчук, Е.Н. Кожевникова
- 499 Возможности высокотехнологичного фенотипирования методом спектроскопии ЯМР на примере метаболического отклика печени крыс на воздействие алкоголя и Рейши
М.С. Крестина, О.Б. Шевелев, И.В. Коптюг, Л.А. Герлинская, С.Е. Пельтек, А.Е. Акулов

Cryopreservation and reproductive technologies	410	Role of the <i>Mucin-2</i> and <i>Kaiso</i> genes in the social behavior of mice <i>E.N. Kozhevnikova, K.M. Achasova, V.S. Korostina, E.B. Prokhortchouk, E.A. Litvinova</i>
367 Applying reproductive technologies and genome resource banking to laboratory animals <i>S.Ya. Amstislavsky, E.Yu. Brusentsev, T.O. Abramova, D.S. Ragaeva, I.N. Rozhkova, T.N. Igonina, E.A. Kizilova, V.A. Naprimerov, N.Yu. Feoktistoiva</i>	413	Phenotyping the males of mouse and rat strains with genetically defined behavioral disturbances in a model of sexual activation <i>M.A. Tikhonova, T.G. Amstislavskaya</i>
372 Effects of growth factors during <i>in vitro</i> culture of mouse and rat embryos <i>E.Yu. Brusentsev, T.N. Igonina, I.N. Rozhkova, D.S. Ragaeva, S.Ya. Amstislavsky</i>	420	Study of the neuronal response to olfactory stimuli in control and LPS-stimulated mice by functional magnetic resonance imaging <i>A.E. Akulov, A.V. Romashchenko, O.B. Shevelev, D.V. Petrovski, A.A. Savelov, M.P. Moshkin</i>
378 A comparison of different cryoprotectant solutions and thawing methods for cryopreservation of embryos of mice and rats <i>T.N. Igonina, E.Yu. Brusentsev, I.N. Rozhkova, V.A. Naprimerov, S.Ya. Amstislavsky</i>	427	Brain metabolites in ISIAH and Wistar rats <i>O.B. Shevelev, A.A. Seryapina, A.L. Markel, M.P. Moshkin</i>
383 Effects of reproductive technologies and SPF status on some physiological and behavioral characteristics in rats with arterial hypertension (ISIAH strain) <i>D.S. Ragaeva, T.O. Abramova, I.N. Rozhkova, E.Yu. Brusentsev, E.V. Kalinichenko, T.N. Igonina, S.Ya. Amstislavsky</i>	432	Proton magnetic resonance spectroscopy of neurometabolites in the hippocampi of aggressive and tame male rats <i>R.G. Gulevich, A.E. Akulov, S.G. Shikhevich, R.V. Kozhemyakina, I.Z. Plyusnina</i>
High-throughput phenotyping	439	Between-strain differences in hypothermic response in mice after intranasal administration of PtO nanoparticles <i>D.V. Petrovskii, A.V. Romashchenko, S.Yu. Troitskii, M.P. Moshkin</i>
388 Conducting and automating the water Morris maze test in SPF conditions <i>N.V. Khotskin, V.A. Kulikov, E.L. Zavyalov, D.V. Fursenko, A.V. Kulikov</i>	445	Changes in the transcriptome of the prefrontal cortex of OXYS rats as the signs of Alzheimer's disease development <i>N.A. Stefanova, E.E. Korbolina, N.I. Ershov, E.I. Rogaev, N.G. Kolosova</i>
394 Behavioral phenotyping of mice deficient for tumor necrosis factor <i>D.V. Fursenko, N.V. Khotskin, V.A. Kulikov, A.V. Kulikov</i>	Modeling of disorders and experimental treatment	
399 Behavioral phenotyping of <i>Kaiso</i> -deficient mice <i>V.S. Korostina, A.V. Kulikov</i>	455	Stress and arterial hypertension: ISIAH rat strain <i>Ye.V. Antonov, Yu.V. Alexandrovich, A.A. Seryapina, L.O. Klimov, A.L. Markel</i>
404 Reproductive effects of the tumor necrosis factor (<i>TNF</i>) deficiency in mice <i>S.O. Maslennikova, G.V. Kontsevaya, M.A. Zolotykh, M.V. Anisimova, N.A. Feofanova, M.P. Moshkin, S.A. Nedospasov, L.A. Gerlinskaya</i>		

- 460 *In vivo* MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model
E.L. Zavjalov, I.A. Razumov, L.A. Gerlinskaya, A.V. Romashchenko
- 466 The morphofunctional and biochemical characteristics of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma in a Syrian hamster model
G.A. Maksimova, M.Y. Pakharukova, E.V. Kashina, N.A. Zhukova, M.N. Lvova, M.V. Khvostov, D.S. Baev, A.V. Katokhin, T.G. Tolstikova, V.A. Mordvinov
- 474 Correlation of susceptibility to ortho-aminoazotoluene-induced hepatocarcinogenesis with Car and Ahr signaling pathway activation in mice
N.V. Baginskaya, E.V. Kashina, M.Yu. Shamanina, S.I. Ilnitskaya, V.I. Kaledin, V.A. Mordvinov
- 480 A model of the artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for examination of the oncolytic activity of vaccinia virus
G.V. Kochneva, A.A. Grazhdantseva, G.F. Sivolobova, A.V. Tkacheva, A.N. Shvalov, A.Yu. Unusova, E.I. Ryabchikova, S.V. Netesov
- 487 Possibility of using a mouse SCID as a model animal to variola virus for evaluating anti-smallpox drug efficacy
K.A. Titova, Al.A. Sergeev, A.S. Kabanov, L.E. Bulychev, Ar.A. Sergeev, D.O. Galahova, A.S. Zamedyanskaya, L.N. Shishkina, O.S. Taranov, V.V. Omigov, E.L. Zavjalov, A.P. Agafonov, A.N. Sergeev
- 494 Role of intestinal mucin-2 in the effectiveness of the treatment of *Helicobacter* spp. infection in laboratory mice
E.A. Litvinova, M.D. Belyaev, A.V. Prokhortchouk, V.S. Korostina, E.B. Prokhortchouk, E.N. Kozhevnikova
- 499 NMR metabolic profiling of the liver following administration of alcohol and the mushroom *Ganoderma lucidum* in rats
M.S. Krestina, O.B. Shevelev, I.V. Koptuyug, L.A. Gerlinskaya, S.E. Peltek, A.E. Akulov



Созданные на основе лабораторных животных генетические и экспериментальные модели патологий человека являются ключевыми объектами современных биологических, биомедицинских и фармакологических исследований, направленных на получение новых фундаментальных знаний, расшифровку механизмов формирования заболеваний, поиск терапевтических мишеней и разработку новых лекарственных препаратов. Представление о масштабности исследований на модельных организмах можно получить при запросе на сайте NCBI (PubMed) словосочетания «animal model», показывающем почти 600 тыс. реферируемых работ. При этом изначально медленное повышение годового числа публикаций приостанавливается в 1980-е годы, а затем начиная с 1990-х переходит в фазу экспоненциального роста, продолжающегося по настоящее время. Приостановка и последующее повышение публикационной активности объясняют два важных события, которые произошли в 1980-е годы и предопределили расцвет фундаментальных и прикладных исследований, основывающихся на использовании лабораторных животных. В 1982 г. Ричард Палмитер и его коллеги сообщили о создании первой трансгенной мыши (*Nature*. 1982. Dec. 16;300(5893):611-615), а семью годами позже (1989 г.) была получена первая нокаутная линия мышей. Разработка технологии целевого выключения (нокаута) отдельных генов была отмечена в 2007 г. Нобелевской премией.

Таким образом, расшифровка геномов человека и лабораторных животных, а также развитие технологий их направленного изменения сформировали новый вектор в организации работ с использованием лабораторных животных, которые были и остаются основными объектами фундаментальных и прикладных биологических исследований, ориентированных на создание новых подходов к лечению болезней и повышению физического и социального благополучия людей. Для управления стремительно растущим разнообразием модельных объектов во всех развитых странах были созданы центры генетических ресурсов (национальные коллекции) лабораторных животных, которые обеспечивают:

- 1) разведение и содержание животных, свободных от видоспецифических патогенов (**specific pathogen free – SPF**);
- 2) формирование криоколлекций биологического материала (эмбрионы, эмбриональные стволовые клетки, мужские и женские гаметы);
- 3) выполнение работ по созданию трансгенных животных;
- 4) высокотехнологичное фенотипирование поведенческих, морфофункциональных и молекулярно-генетических процессов, включая прижизненный имиджинг и омиксные технологии.

Мировое развитие инфраструктуры для работ с использованием генетического разнообразия лабораторных животных пришлось на первое постперестроечное десятилетие. В этот период во многих российских университетах и научно-исследовательских институтах происходило сокращение и даже полное закрытие исследований, выполняемых на лабораторных животных. Недофинансирование текущих расходов и отсутствие современной инфраструктуры сказались на качестве экспериментальных объектов, которые по принятым на тот момент стандартам надлежащей лабораторной практики должны были иметь **SPF-статус и подтвержденное генетическое соответствие**. В 2003 г., осознавая пагубность сложившейся тенденции, академик В.К. Шумный сумел убедить Правительство Российской Федерации в необходимости выделения средств на постройку в ИЦиГ СО РАН современного вивария для производства лабораторных животных **SPF-статуса**. Но уже в ходе реализации проекта стало понятно, что потребителями свободных от патогенов животных могут быть научные организации, которые в состоянии обеспечить сохранение **SPF-статуса в течение эксперимента**, длящегося в отдельных случаях многие месяцы. На тот момент условиями для **SPF-содержания** располагала только одна лаборатория в ИБХ РАН. Поэтому в 2007 г. общая концепция **SPF-вивария была пересмотрена**, и на его базе началось создание Центра генетических ресурсов (ЦГР) лабораторных животных с полным набором технологических компетенций, соответствующим самым высоким требованиям для подобных объектов научной инфраструктуры. По сути, это первый в Российской Федерации ресурсный центр, уникальность которого подтверждает включение ЦГР в национальные реестры уникальных научных установок (RFMEFI61914X0005) и центров коллективного пользования (ЦКП) федерального значения (RFMEFI62114X0010).

В этом выпуске «Вавиловского журнала генетики и селекции» представлены первые итоги работы ЦГР, сформированного на базе SPF-вивария ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Значительная часть статей была подготовлена на основе докладов, представленных на 1-й Ежегодной конференции пользователей ЦКП «Центр генетических ресурсов», проведенной в апреле 2015 г. Эти статьи охватывают практически все направления деятельности ЦГР, за исключением работ в области трансгенеза, технология которого находится на стадии освоения. Авторы – ученые из 12 научных учреждений России.

Журнал открывают статьи, посвященные криоархивированию и репродуктивным технологиям. Их значимость нарастает по мере увеличения числа генетических линий лабораторных животных, поддержание которых только путем племенного разведения становится чрезвычайно затратным при увеличении количества линий до 100 и более. Технологии в этой области развиваются так быстро, что включенная в номер статья о формировании криоархива представляет сейчас лишь историческую ценность, поскольку к моменту подготовки выпуска в ЦГР были освоены методы работы с двухклеточными эмбрионами. Такой подход соответствует стандартам криоархивирования, принятым в ведущих мировых центрах. «Синхронизация» методов замораживания, размораживания и пересадки эмбрионов с общепринятыми технологиями является необходимым условием для решения важнейшей задачи ЦГР – обеспечения российским ученым свободного доступа к мировым ресурсам генетического разнообразия модельных организмов. Вместе с тем представленный в этом же разделе опыт оптимизации репродуктивных технологий, а также анализ фенотипических эффектов, обусловленных направленными воздействиями на развивающиеся эмбрионы, вызывают несомненный научный интерес.

Следующий раздел посвящен высокотехнологическому фенотипированию мышей и крыс, в том числе генетических линий крыс, полученных селекционными методами в ИЦиГ СО РАН. Отрадно, что ряд работ основан на изучении поведенческих, иммунофизиологических и репродуктивных характеристик у линий мышей с целевыми мутациями, которые получены российскими учеными, правда в зарубежных лабораториях. Таким образом, ЦГР начинает выполнять важнейшую функцию национальных

коллекций, а именно собирать и изучать генетические линии, полученные соотечественниками. Новизна результатов, представленных в этом разделе, определяется, с одной стороны, оригинальностью исследуемых генотипов, с другой – привлечением к фенотипированию современных методических подходов, таких как функциональная магнитно-резонансная томография, ЯМР спектроскопия, анализ кишечного микробиома и т. д. Материалы публикуемых статей значительно расширяют существующие представления о плейотропных эффектах изучаемых генов. Это имеет не только теоретическое, но и прикладное значение. Фенотипические изменения, наблюдаемые у нокаутных животных, позволяют экспериментально обосновать модели генетически детерминированных нарушений структур и функций организма, а также указать новые направления поиска средств терапевтического воздействия.

Третий раздел выпуска объединяет работы по генетическому и экспериментальному моделированию патологий хирургическими и фармакологическими методами. Раздел открывает небольшой обзор, посвященный истории создания и изучения линии крыс с наследственной стресс-индуцированной гипертензией (НИСАГ). Эта линия является одной из «визитных карточек» ФИЦ ИЦиГ СО РАН в области генетического моделирования социально значимых заболеваний человека. Следует подчеркнуть, что в создании многих модельных объектов ключевую роль играет обеспеченная работой ЦГР возможность использовать адекватные генетические линии лабораторных животных. В частности, это относится к инокуляции иммунодефицитным линиям мышей культур опухолевых клеток человека, тем самым удается получить экспериментальные модели канцерогенеза, которые чрезвычайно востребованы разработчиками новых средств онкодиагностики и онкотерапии. Две статьи из этого раздела относятся к новому для российской фармакологии направлению – оценке фармакологической безопасности, которая предполагает испытание лекарственных средств на животных с различными патологиями.

В заключение выражаю надежду на то, что читатель этого специального выпуска «Вавиловского журнала генетики и селекции» найдет полезную информацию и включится в общий поток пользователей Центра генетических ресурсов лабораторных животных, сформированного на базе SPF-вивария ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

*Научный редактор номера
профессор М.П. Мошкин*

Применение репродуктивных технологий и создание криобанка генетических ресурсов лабораторных животных

С.Я. Амстиславский¹, Е.Ю. Брусенцев¹, Т.О. Абрамова¹, Д.С. Рагаева¹, И.Н. Рожкова¹, Т.Н. Игонина¹, Е.А. Кизилова¹, В.А. Напримеров¹, Н.Ю. Феоктистова²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

Современные криобанки генетических ресурсов лабораторных животных основаны на замораживании преимплантационных эмбрионов и семени. Криобанки создают и используют в сочетании с современными репродуктивными технологиями, такими как редеривация, культивирование *in vitro* и трансплантация эмбрионов. В ИЦиГ СО РАН 13 линий мышей и крыс редеривированы, создан криобанк, в котором хранятся 32 линии мышей и крыс. Проведены успешные эксперименты по переводу в криобанк других лабораторных животных, помимо мышей и крыс. Были криоконсервированы эмбрионы двух видов хомячков рода *Phodopus* (джунгарского и Кэмпбелла); их жизнеспособность была подтверждена успешным развитием после размораживания в условиях *in vitro* и *in vivo* (рождение потомства после трансплантации реципиенту). Было продемонстрировано стимулирующее влияние гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора при культивировании преимплантационных зародышей этих двух видов мохноногих хомячков. Кроме того, семя хомячков джунгарского (*Phodopus sungorus*) и Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*), котов домашнего (*Felis catus*) и амурского (*Prionailurus bengalensis euptilurus*), а также красной рыси (*Lynx rufus*) было заморожено и криоконсервировано. Исследования с применением методов флуоресцентной окраски SYBR Green/PI и последующей конфокальной микроскопии показали, что более 40 % замороженного семени амурского кота сохраняет жизнеспособность в процессе криоконсервации. Таким образом, впервые была продемонстрирована возможность успешного замораживания семени дикого представителя семейства кошачьих *Prionailurus bengalensis euptilurus*. В статье дан обзор этих работ, а также обсуждаются перспективы развития криобанка и применения репродуктивных технологий для сохранения различных лабораторных видов млекопитающих.

Ключевые слова: криобанк генетических ресурсов; эмбрионы; семя; мыши; крысы; хомячки; кошачьи.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Абрамова Т.О., Рагаева Д.С., Рожкова И.Н., Игонина Т.Н., Кизилова Е.А., Напримеров В.А., Феоктистова Н.Ю. Применение репродуктивных технологий и создание криобанка генетических ресурсов лабораторных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):367-371. DOI 10.18699/VJ15.045

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Amstislavsky S.Ya., Brusentsev E.Yu., Abramova T.O., Ragaeva D.S., Rozhkova I.N., Igonina T.N., Kizilova E.A., Naprimerov V.A., Feoktistoiva N.Yu. Applying reproductive technologies and genome resource banking to laboratory animals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):367-371. DOI 10.18699/VJ15.045

DOI 10.18699/VJ15.045

УДК 575:591.3:592.599

Поступила в редакцию 22.06.2015 г.

Принята к публикации 10.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Applying reproductive technologies and genome resource banking to laboratory animals

S.Ya. Amstislavsky¹, E.Yu. Brusentsev¹, T.O. Abramova¹, D.S. Ragaeva¹, I.N. Rozhkova¹, T.N. Igonina¹, E.A. Kizilova¹, V.A. Naprimerov¹, N.Yu. Feoktistoiva²

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

² A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The Genome Resource Bank (GRB) is a repository of frozen biological material, including semen and embryos. Cryobanking is used in combination with modern reproductive technologies such as rederyivation, *in vitro* culture and embryo transfer. Thirteen mouse and rat strains have been re-derived and 32 are kept frozen in the cryostorage at the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. Some other laboratory animal species have been cryopreserved as well. Embryos of two hamster species (Djungarian and Campbell's) in the genus *Phodopus* were cryopreserved and the viability of thawed embryos was proved by their successful development *in vitro* and *in vivo* (by transfer to a recipient). A positive effect of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was demonstrated with both these *Phodopus* species. Furthermore, semen of Djungarian (*Phodopus sungorus*) and Campbell's (*Phodopus campbelli*) hamsters, domestic cat (*Felis catus*), amur cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) and bobcat (*Lynx rufus*) was frozen and cryopreserved. Double staining by SYBR Green/PI and subsequent confocal microscopy demonstrated that more than 40 % of amur cat semen retained viability after cryopreservation. This is the world's first reported successful freezing of semen of this wild felid (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). This article reviews the results and discusses prospects of using reproductive technologies for conservation of laboratory species.

Key words: cryobanking genetic resources; embryos; semen; mice; rats; hamsters; felids.

Несмотря на то что уже успешно заморожены эмбрионы и гаметы нескольких десятков видов млекопитающих (Fickel et al., 2007; Saragusty, Arav, 2011), а их криоконсервация стала рутинной практикой работы с наиболее общедоступными видами лабораторных животных, мышами и крысами (Rall et al., 2000; Landel, 2005; Yoshiki, 2009), до сих пор не существует единого универсального протокола замораживания и оттаивания эмбрионов даже для мышей. Методики замораживания эмбрионов, семени и ооцитов для крыс разработаны существенно слабее, чем для мышей (Mazur et al, 2008). Соответственно, в мире имеются лишь единичные криобанки генетических ресурсов крыс (Agca, 2012). По отношению ко многим видам млекопитающих, в том числе и некоторым видам лабораторных грызунов, способы замораживания эмбрионов и/или семени пока находятся лишь в стадии разработки и требуют тщательного изучения биологии конкретного вида (Амстиславский и др., 2015). В наибольшей мере это относится к диким и исчезающим видам млекопитающих, в частности к большинству видов семейства кошачьих (Amstislavsky et al., 2012).

Цель данной статьи – общий обзор направлений исследований в области создания криобанков разных видов млекопитающих, проводимых сектором криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН. Конкретными задачами являются: 1) общий обзор работы, проведенной в ИЦиГ СО РАН по созданию криобанка эмбрионов мышей и крыс; 2) анализ текущего состояния исследований по созданию криобанков эмбрионов и семени других лабораторных животных, помимо мышей и крыс, на примере проведенного нами цикла экспериментов с хомячками джунгарским и Кэмпбелла; 3) анализ текущего состояния исследований по сохранению видов кошачьих путем замораживания семени.

Лабораторные мыши и крысы

Криобанки позволяют оптимизировать работу современных вивариев. В криобанке, созданном при ИЦиГ СО РАН, хранятся в замороженном состоянии эмбрионы 32 линий мышей и крыс. При помощи криобанка и репродуктивных технологий в ИЦиГ СО РАН удалось получить потомство и редеривировать, то есть перевести из конвенционального в SPF-статус (*specific pathogen free*), 7 линий/сублиний крыс, а также 5 линий и 1 мутантный сток мышей (таблица). В ходе проделанной работы решались практические задачи пополнения коллекции SPF-вивария уникальными линиями, а также совершенствовалась сама технология. Кроме того, исследовались научные аспекты криобиологии и репродуктивной биологии (Брусенцев и др., 2014; Амстиславский и др., 2015).

Хомячки рода *Phodopus*

Помимо мышей и крыс, объектами криоконсервации в качестве лабораторных животных, пригодных для биомедицинских исследований, становятся другие млекопитающие. Однако по отношению ко многим видам животных, в том числе редко используемым или экзотическим, технология криоконсервации эмбрионов и/или семени все еще не создана. В ИЦиГ СО РАН ведутся работы и в этом направлении.

Список линий, сублиний и стоков мышей и крыс, переведенных в SPF-статус посредством репродуктивных технологий или архивированных в криобанке в ИЦиГ СО РАН

Название	Статус
Крысы	
ISIAH/lcgn* (a)	Редеривирована
ISIAH/lcgn (c)	Редеривирована
GK/lcgn	Редеривирована
OXYS	Редеривирована
Tame rats	Редеривирована
WAG	Редеривирована
Wistar	Редеривирована
Мыши	
ICR	Редеривирована
WR/y	Помещена в криобанк
YT	Помещена в криобанк
PT	Помещена в криобанк
SCID/SHO-Prkdcscid	Редеривирована
C57BL/6J-A ^y	Редеривирована
129S2/SvPasCrl	Помещена в криобанк
MAO-1/lcgn (гомозиготные)	Помещена в криобанк
HT1AC/lcgn	Помещена в криобанк
GM-3/lcgn	Помещена в криобанк
GM-83/lcgn	Помещена в криобанк
HT1AA/lcgn	Помещена в криобанк
ASC/lcgn	Помещена в криобанк
GM-9/lcgn	Помещена в криобанк
OG-2/lcgn	Помещена в криобанк
GM-20/lcgn	Помещена в криобанк
GM-11/lcgn	Помещена в криобанк
B6-1473G/lcgn	Редеривирована
NodSCID/CB17-Prkdcscid/Ncr	Помещена в криобанк
BALB/c	Помещена в криобанк
C57BL/6Kaiso(102)	Помещена в криобанк
C57BL/MUC2(103)	Помещена в криобанк
CD-1	Помещена в криобанк
B6-1473C/lcgn	Редеривирована
HT1AN/lcgn	Редеривирована
GKSF-78/lcgn	Помещена в криобанк
MAO-1/lcgn (гетерозиготные)	Помещена в криобанк
DBA/2RccHsd	Помещена в криобанк
CBA/Lac	Помещена в криобанк
C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J	Помещена в криобанк

* lcgn означает, что линия получена в ИЦиГ СО РАН.

Хомячки рода *Phodopus* являются востребованными лабораторными моделями (Феоктистова, 2008). Хомячок Кэмпбелла является предпочтительной моделью в исследованиях, направленных на изучение заботы о потомстве и отцовского поведения (Феоктистова, 2008). Джунгарский хомячок является предпочтительным видом для исследования циркадных и сезонных адаптаций, эффектов фотопериодизма (Steinlechner et al., 2002; Gregg, Wynne-Edwards, 2006).

Развитие преимплантационных эмбрионов у джунгарского хомячка (Nieder, Caprio, 1990) и хомячка Кэмпбелла (Erb, Wynne-Edwards, 1993) изучено, но до сих пор репродуктивные технологии по отношению к этим видам не применяли, за исключением единичной попытки культивирования *in vitro* морул и ранних бластоцист джунгарского хомячка (Nieder, Caprio, 1990). Что касается семени, то в литературе отсутствуют какие-либо сообщения о замораживании семени хомячков рода *Phodopus*.

Впервые в мировой практике нам удалось успешно заморозить эмбрионы двух видов хомячков из рода *Phodopus*, а именно: хомячков джунгарского (*P. sungorus*) (Brusentsev et al., 2015) и Кэмпбелла (*P. campbelli*) (Amstislavsky et al., 2015). Впервые продемонстрирована возможность успешного культивирования ранних стадий развития эмбрионов *in vitro* хомячков джунгарского (Brusentsev et al., 2015) и Кэмпбелла (*P. campbelli*) (Amstislavsky et al., 2015). Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что среда R1ЕСМ является более подходящей, чем НЕСМ, для культивирования *in vitro* эмбрионов этих видов хомячков (Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015), несмотря на то что первая была разработана специально для крыс (Miyoshi et al., 1995), а последняя – для золотистых хомячков (Schini, Bavister, 1988).

В наших исследованиях показано существенное ускорение развития *in vitro* дробящихся эмбрионов хомячков Кэмпбелла и джунгарского после процедур замораживания–оттаивания путем воздействия на них гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015). Доза этого фактора (2 нг/мл) была выбрана на основании изучения литературы по воздействию GM-CSF на развитие эмбрионов мышей, крыс и сирийских хомячков (Robertson et al., 2001; Elaimi et al., 2012) и собственных пилотных экспериментов. Этот фактор роста именно в данной дозе активно начали применять в клиниках ЭКО для повышения эффективности репродуктивных технологий по отношению к человеку (Ziebe et al., 2013). Именно в выбранной дозе GM-CSF в условиях культивирования *in vitro* достоверно повышает образование бластоцист (Brusentsev et al., 2015) и увеличивает в них число бластомеров (Amstislavsky et al., 2015) при культивировании эмбрионов хомячков рода *Phodopus*. Следует отметить, что индекс фрагментации был наименьшим тогда, когда в среду культивирования добавляли GM-CSF (Amstislavsky et al., 2015).

Криоконсервация семени лабораторных животных является важным звеном при создании современных криобанков генетических ресурсов (Amstislavsky и др., 2015). Хотя в настоящее время заморожено семя нескольких десятков видов млекопитающих, до сих пор отсутству-

ют публикации по замораживанию семени хомячков рода *Phodopus*. В наших исследованиях на хомячках джунгарском и Кэмпбелла было проведено сравнение нескольких протоколов замораживания и продемонстрирована возможность успешной криоконсервации эпидидимального семени этих видов с использованием разбавителя семени CaniPlus Chill с глицерином и яичным желтком в качестве криопротектора (данные пока не опубликованы).

В связи с ограниченностью ресурсов и высокими стандартами при разведении и содержании животных для биомедицинских исследований существует потребность создания криобанков лабораторных животных других таксонов, помимо мышей и крыс (Agca, 2012). Таким образом, разработка комплекса репродуктивных технологий по отношению к хомячкам джунгарскому и Кэмпбелла может оптимизировать их содержание и облегчить обмен генетическим материалом между различными лабораториями. С другой стороны, изучение особенностей репродуктивной биологии хомячков рода *Phodopus* и специфики применения технологий криоконсервации эмбрионов и гамет этих видов является важным для решения проблемы сохранения генетических ресурсов Cricetidae в целом.

Домашние и дикие виды кошачьих (Felidae)

В настоящее время насчитывается 37 видов кошачьих, из них 36 видов являются исчезающими (либо включают в себя исчезающие подвиды) (Амстиславский, Анфиногенова, 2010). Кошек иногда применяют в качестве лабораторных животных (Agca, 2012). Благодаря сходству генома кошачьих с геномом человека (Driscoll et al., 2009) и похожим клиническим проявлениями некоторых заболеваний у человека и кошки, последняя незаменима для проведения некоторых медицинских исследований (Griffin, Baker, 2002). Таким образом, разработка репродуктивных технологий по отношению к кошачьим имеет значение и для сохранения исчезающих видов, и для медико-биологических исследований. Однако работа с исчезающими видами кошачьих сопряжена с определенными сложностями, в частности с тератоспермией (Pukazhenthil et al., 2006).

В наших предварительных исследованиях было проведено сравнение нескольких протоколов замораживания семени на домашней кошке (Абрамова и др., 2014). В 2013 г. совместно с группой кандидата биологических наук С.В. Найдено из Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова (ИПЭЭ) РАН мы получили, заморозили и поместили в криохранилище семя амурского (дальневосточного) лесного кота (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). Исследования с применением методов флуоресцентной окраски SYBR Green/PI и последующей конфокальной микроскопии показали, что более 40 % замороженного семени сохраняет жизнеспособность в процессе криоконсервации. Таким образом, впервые была продемонстрирована возможность успешного замораживания семени *Prionailurus bengalensis euptilurus*, который внесен в Красную книгу Приморского края. В 2015 г. список видов был расширен: получено и заморожено семя не только от амурских и домашних котов, но и от самцов красной рыси (*Lynx rufus*).

В наших исследованиях также сделана первая успешная попытка получения дробящихся эмбрионов домашней кошки после ЭКО и последующего культивирования *in vitro* (Абрамова и др., 2014; Амстиславский и др., 2014). Конечной целью данного исследования является получение межвидовых гибридов кошачьих посредством репродуктивных технологий. Как показано нами ранее, межвидовые гибриды могут быть успешно использованы для разработки технологии сохранения исчезающих видов (Amstislavsky et al., 2004; 2006).

На основании проделанной работы можно сделать следующие заключения:

1. Существующие репродуктивные технологии (криоконсервация, культивирование и трансплантация эмбрионов) были применены к лабораторным мышам и крысам, главным образом уникальным линиям, полученным в ИЦиГ СО РАН; создан криобанк генетических ресурсов этих линий и проведена работа по программе редеривации.

2. Впоследствии репродуктивные технологии были усовершенствованы и применены по отношению к другим ценным лабораторным моделям, таким как хомячки рода *Phodopus* и таким представителям семейства кошачьих, как домашняя кошка, амурский (дальневосточный) лесной кот и красная рысь.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа выполнена на базе вивариев ИЦиГ СО РАН при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ № 15-04-03258. Авторы выражают благодарность сотрудникам ИПЭиЭ им. А.Н. Северцова РАН: Е.В. Павловой, М.Н. Ерофеевой и С.В. Найдено за помощь в получении семени амурского лесного кота и красной рыси и за предоставленную возможность работы с этими видами кошачьих.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Абрамова Т.О., Кизилова Е.А., Масленникова С.О., Рожкова И.Н., Байбородин С.И., Брусенцев Е.Ю., Найдено С.В., Амстиславский С.Я. Криоконсервация семени кошачьих. Биофизика живой клетки. 2014;10:17-19.

Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Рожкова И.Н. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных. Онтогенез. 2015; 46(2): 67-81.

Амстиславский С.Я., Абрамова Т.О., Брусенцев Е.Ю., Кизилова Е.А. Криоконсервация и сохранение биоразнообразия. Природа. 2014;9:24-33.

Амстиславский С.Я., Анфиногенова Я.Д. Зверь, приручивший человека. Химия и жизнь – XXI век. 2010;5:28-33.

Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Амстиславский С.Я. Традиционные и современные подходы к культивированию преимплантационных эмбрионов *in vitro*. Онтогенез. 2014;45(2):73-88.

Феоктистова Н.Ю. Хомячки *Phodopus*. Систематика, филогеография, экология, физиология, поведение, химическая коммуникация. М., 2008.

Agca Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. Theriogenology. 2012;78:1653-1665. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.08.012

Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Igonina T., Abramova T., Rozhkova I. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*). Theriogenology. 2015;83:1056-1063. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.013

Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora. Reprod. Dom. Anim. 2012;47:164-175. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01886.x

Amstislavsky S., Kizilova E., Ternovskaya Y., Zudova G., Lindeberg H., Aalto J., Valtonen M. Embryo development and embryo transfer in the European mink (*Mustela lutreola*), an endangered mustelid species. Reprod. Fert. Dev. 2006;18:459-467. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/RD05135>

Amstislavsky S., Aalto J., Järvinen M., Lindeberg H., Valtonen M., Zudova G., Ternovskaya Y. Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients. Theriogenology. 2004;62:458-467. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2003.10.011

Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Abramova T.O., Igonina T., Naprimеров V., Feoktistova N., Amstislavsky S. Cryopreservation, *in vitro* culture and transfer of preimplantation embryos in Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). Reprod. Dom. Anim. 2015;50:677-683. DOI: 10.1111/rda.12564

Driscoll C.A., Clutton-Brock J., Kitchener A.C., O'Brien S.J. The taming of the cat. Genetic and archaeological findings hint that wildcats became housecats earlier – and in a different place – than previously thought. Sci. Am. 2009;300:68-75.

Elaimi A., Gardner K., Kistnareddy K., Harper J. The effect of GM-CSF on development and aneuploidy in murine blastocysts. Hum. Reprod. 2012;27:1590-1595. DOI: 10.1093/humrep/des108

Erb G.E., Wynne-Edwards K.E. Preimplantation endocrinology in the Djungarian hamster (*Phodopus campbelli*): progesterone, estrogen, corpora lutea, and embryonic development. Biol. Reprod. 1993;49: 822-830. DOI: 10.1095/biolreprod49.4.822

Fickel J., Wagener A., Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. Eur. J. Wildl. Res. 2007;53: 81-89.

Gregg J.K., Wynne-Edwards K.E. In uniparental *Phodopus sungorus*, new mothers, and fathers present during the birth of their offspring, are the only hamsters that readily consume fresh placenta. Dev. Psychobiol. 2006;48:528-536. DOI: 10.1002/dev.20174

Griffin B., Baker H.J. Domestic cats as laboratory animals. Laboratory Animal Medicine. N.Y.: Acad. Press, 2002.

Landel C.P. Archiving mouse strains by cryopreservation. Lab. Anim. 2005;34:50-57.

Mazur P., Leibo S.P., Seidel G.E.Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. Biol. Reprod. 2008;78:2-12. DOI: 10.1095/biolreprod.107.064113

Miyoshi K., Abeydeera L.R., Okuda K., Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. J. Reprod. Fert. 1995;103:27-32. DOI: 10.1530/jrf.0.1030027

Nieder G.L., Caprio T.L. Early embryo development in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). Mol. Reprod. Dev. 1990;27:224-229.

Pukazhenthil B.S., Neubauer K., Jewgenow K., Howard J., Wildt D.E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. Theriogenology. 2006;66:112-121. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.020

Rall W.F., Schmidt P.M., Lin X., Brown S.S., Ward A.C., Hansen C.T. Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and redervation of rat and mouse models. ILAR J. 2000;41:221-227. DOI: 10.1093/ilar.41.4.221

- Robertson S.A., Sjöblom C., Jasper M.J., Norman R.J., Seamark R.F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 2001;64:1206-1215. DOI: 10.1095/biolreprod.64.4.1206
- Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction.* 2011; 141:1-19. DOI: 10.1530/REP-10-0236
- Schini S.A., Bavister B.D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.* 1988;39:1183-1192. DOI: 10.1095/biolreprod39.5.1183
- Steinlechner S., Stieglitz A., Ruf T. Djungarian hamsters: a species with a labile circadian pacemaker? Arrhythmicity under a light-dark cycle induced by short light pulses. *J. Biol. Rhythms.* 2002;17:248-258. DOI: 10.1177/074873040201700308
- Yoshiki A., Ike F., Mekada K., Kitaura Y., Nakata H., Hiraiwa N., Mochida K., Ijuin M., Kadota M., Murakami A., Ogura A., Abe K., Moriwaki K., Obata Y. The mouse resources at the RIKEN BioResource center. *Exp. Anim.* 2009;58:85-96. DOI: <http://doi.org/10.1538/expanim.58.85>
- Ziebe S., Loft A., Povlsen B.B., Erb K., Agerholm I., Aasted M., Gabrielsen A., Hnida C., Zobel D.P., Munding B., Bendz S.H., Robertson S.A. **A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for *in vitro* fertilization.** *Fertil. Steril.* 2013;99: 1600-1609. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.043

Эффекты воздействия факторов роста при культивировании *in vitro* эмбрионов мышей и крыс

Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Иголина, И.Н. Рожкова, Д.С. Рагаева, С.Я. Амстиславский

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

В работе исследовано развитие в культуре *in vitro* эмбрионов мышей линий ICR, HT1AN/Icgn, HT1AC/Icgn и C57BL/6J-A^y, а также крыс линии OXYS/Icgn при воздействии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и эпидермального фактора роста (EGF). Зародыши как мышей, так и крыс вначале замораживали, согласно стандартному протоколу программного замораживания с использованием глицерина и сахарозы в качестве криопротекторов, а после размораживания культивировали в среде R1ECM (rat 1-cell embryo culture medium) в течение либо 24 ч (мыши), либо 72 ч (крысы). Эффекты факторов роста на мышах изучали на 8-клеточных, а на крысах – на 2-, 4-клеточных зародышах. Воздействие GM-CSF приводило к возрастанию процента развивающихся эмбрионов у мышей обеих линий (HT1AC/Icgn и C57BL/6J-A^y); в то же время какого-либо эффекта воздействия EGF на зародыши мышей обнаружено не было. На крысах ситуация была обратной. Воздействие EGF приводило к ускорению развития до стадии бластоцисты у крыс линии OXYS/Icgn, но какого-либо эффекта воздействия GM-CSF на зародыши крыс не было. При совместном культивировании 4-клеточных эмбрионов мышей линии HT1AN/Icgn с более поздними стадиями развития (зародышами на стадии морулы) линии ICR, наблюдается ускорение развития. Результаты представленных экспериментов свидетельствуют о видовой специфике воздействия факторов роста на эмбрионы мышей и крыс, а также демонстрируют, что совместное культивирование эмбрионов более поздних стадий (морулы) мышей с более ранними (4-клеточные зародыши) оказывает стимулирующее влияние на последние.

Ключевые слова: преимплантационные эмбрионы; культивирование *in vitro*; факторы роста; мыши; крысы; сокультивирование.

Effects of growth factors during *in vitro* culture of mouse and rat embryos

E.Yu. Brusentsev, T.N. Igonina, I.N. Rozhkova, D.S. Ragaeva, S.Ya. Amstislavsky

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

In vitro culture of preimplantation embryos of ICR, HT1AN/Icgn, HT1AC/Icgn and C57BL/6J-A^y mouse strains as well as in OXYS/Icgn rat strain in media containing granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or epidermal growth factor (EGF) has been studied. Both mouse and rat embryos were first frozen in a programmable freezer after a standard protocol using a mixture of glycerol and sucrose as cryoprotectants, thawed and cultured *in vitro* in R1ECM (rat one-cell embryo culture medium) for 24 hours (mice) and 72 hours (rats). For the *in vitro* culture experiments with these growth factors, 8-cell frozen-thawed mouse embryos and 2–4-cell frozen-thawed rat embryos were used. Supplementation of the culture medium with GM-CSF improved the rate of embryonic development in HT1AC/Icgn and C57BL/6J-A^y strain mice, while EGF had no effect. The reverse was true of the rats. Supplementation of the culture medium with EGF increased the percentage of developing blastocysts in OXYS/Icgn rat strain, while GM-CSF had no effect. Co-culture of four-cell embryos of HT1AN/Icgn strain mice with more advanced embryonic stages (morulas) of a different strain ICR led to the facilitation preimplantation embryo development. Experimental results presented here reveal the species-specific effects of growth factors on mouse and rat embryos and indicate that co-culture of different stages of embryo development have stimulatory effects on earlier stages.

Key words: preimplantation embryos; *in vitro* culture; growth factors; mice; rats; co-culture.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Брусенцев Е.Ю., Иголина Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Амстиславский С.Я. Эффекты воздействия факторов роста при культивировании *in vitro* эмбрионов мышей и крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):372-377. DOI 10.18699/VJ15.046

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

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 Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):372-377. DOI 10.18699/VJ15.046

DOI 10.18699/VJ15.046

УДК 573.7:575:591.3

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

Принята к публикации 10.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

✉ e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих является основой современных репродуктивных технологий (Брусенцев и др., 2014). Относительно недавно в отечественных и зарубежных клиниках экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) стали активно использовать гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) с целью увеличения доли успешно имплантировавшихся зародышей и снижения числа абортос (Ziebe et al., 2013).

В настоящее время доступна среда EmbryoGen, содержащая GM-CSF в дозе 2 нг/мл, применяемая в клиниках ЭКО по всему миру. Ранее было показано, что добавление в культуральную среду этого фактора существенно ускоряет развитие эмбрионов и у некоторых видов грызунов, в частности у мышей (Robertson et al., 2001; Sjöblom et al., 2005) и хомячков Кэмпбелла (Amstislavsky et al., 2015).

Другим перспективным фактором, ускоряющим развитие эмбрионов и повышающим вероятность их имплантации, является эпидермальный фактор роста (EGF). Экспериментально показано, что воздействие EGF при культивировании эмбрионов *in vitro* повышает долю имплантирующихся зародышей как у мышей (Morita et al., 1994), так и у крыс (Aflalo et al., 2007).

Следует, однако, отметить, что при естественном развитии зародышей *in utero* на них действует комплекс паракринных и аутокринных ростовых факторов (Brigstock et al., 1989). Более того, известно, что в группе эмбрионы мышей развиваются намного лучше, чем поодиночке (Paria, Dey, 1990). Относительно недавно этот эффект был подтвержден и на эмбрионах кошек (Spindler, Wildt, 2002), в том числе и при совместном культивировании их с эмбрионами мышей (Spindler et al., 2006).

Целями данной работы было: 1) изучить эффект применения двух различных факторов роста (GM-CSF и EGF) на двух линиях мышей (HT1AC/Icgn, C57BL/6J-A^y) и крысах линии OXYS/Icgn; 2) проверить эффективность сокультивирования различных стадий развития преимплантационных зародышей мышей линий ICR и HT1AN/Icgn.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок мышей C57BL/6J-A^y (возраст 8–10 нед, $n = 12$), HT1AC/Icgn (возраст 8–10 нед, $n = 15$), ICR (возраст 8–10 нед, $n = 8$) и HT1AN/Icgn (возраст 8–10 нед, $n = 8$), а также половозрелых самок крыс линии OXYS/Icgn (возраст 10–14 нед, $n = 12$). Для получения эмбрионов самок мышей и крыс спаривали с самцами тех же линий и того же возраста. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики (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 преимплантационных эмбрионов мышей и крыс

Мыши. У самок мышей линий C57BL/6J-A^y, HT1AC/Icgn,

ICR и HT1AN/Icgn вызывали суперовуляцию по стандартной схеме, описанной ранее (Амстиславский и др., 2013). Каждую суперовулированную самку затем ссаживали на ночь с самцом той же линии. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности.

Крысы. Самок крыс линии OXYS/Icgn в состоянии эструса, определенного путем исследования влажных мазков, ссаживали на ночь с самцами той же линии. День обнаружения сперматозоидов во влажном мазке считали первым днем беременности.

Самок мышей подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков вечером второго дня (для получения ранних стадий развития) или утром третьего дня (для получения более поздних стадий развития) беременности. Самок крыс подобным же образом подвергали эвтаназии на утро третьего дня беременности. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой EMCARE Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, США), как описано ранее (Амстиславский и др., 2013). Эмбрионы подсчитывали и оценивали с использованием стереомикроскопа Leica S8 APO с увеличением до $\times 80$ (Leica Microsystems, Германия). Качество зародышей оценивали с учетом стадии эмбрионального развития и числа жизнеспособных клеток (Emiliani et al., 2000). Некачественные эмбрионы были отбракованы; зародыши хорошего качества промывали в трех каплях той же среды и замораживали.

Замораживание эмбрионов

Для замораживания преимплантационных зародышей мышей и крыс всех линий использовали 10 %-й v/v глицерин (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) с добавлением 0,1 М сахарозы (Sigma, США).

После насыщения криопротектором 10–15 эмбрионов помещали в 0,25 мл-е пластиковые соломины (Cryo Bio System, Франция), каждая из которых была заполнена тремя порциями криопротектора, разделенными двумя воздушными пузырьками (10–20 мкл каждого). Первый сектор: EMCARE™ Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, США). Второй сектор: раствор, полученный путем растворения 0,1 М сахарозы (Sigma, США) в EMCARE™ Ethylene Glycol 1,5 М (ICPBio Reproduction, США). Третий сектор: раствор, полученный путем растворения 0,3 М сахарозы (Sigma, США) в EMCARE™ Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, США). Эмбрионы помещали в центральную часть (второй сектор) соломины.

Соломины с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL 8 800 (CryoLogic, Австралия) и охлаждали в соответствии со следующей программой: от 18 °C до –7 °C со скоростью –1 °C/мин; 10 мин при –7 °C, сидинг (путем прикосновения к соломине охлажденным пинцетом) через 1 мин; от –7 °C до –35 °C со скоростью –0,3 °C/мин; 10 мин при –35 °C и погружали в жидкий азот при этой температуре.

Оттаивание эмбрионов

Соломины доставали из резервуара с жидким азотом, выдерживали в течение 40 с при комнатной температуре, а затем помещали на 40 с в водяную баню при 30,0 °C. Ранее было показано, что скорость оттаивания с использо-

ванием этого метода составляет около 300 °C/мин (Renard, Babinet, 1984).

Отмывание и культивирование эмбрионов

После размораживания эмбрионов содержимое соломины выдавливали на чашку Петри (Corning, США) и выдерживали в этой смешанной капле в течение 15 мин при комнатной температуре. Криопротектор удаляли при помощи промывания размороженных эмбрионов в трех каплях (50 мкл) среды Holding Solution (EMCARE, ICPBio Reproduction, США).

После удаления криопротектора, как описано выше, эмбрионы, независимо от их качества, последовательно промывали в 10 каплях стерильного Holding Solution (200 мкл EMCARE, ICPBio Reproduction, США) со сменой стеклянных капилляров для стерильного переноса между каплями и оценивали визуально с помощью микроскопа M DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) при увеличении $\times 50$ и $\times 100$. Зародыши, у которых было разрушено более 25 % бластомеров, были отбракованы, остальные поставлены на культивирование *in vitro*. Эмбрионы мышей (C57BL/6J-A^y и HT1AC/Icgn) и крыс линии OXYS/Icgn переносили в 50 мкл среды R1ECM (Amstislavsky et al., 2015).

Сформировали по три тестовые группы для контрольных экспериментов (без сокультивирования) для каждой из двух исследуемых линий мышей и одной линии крыс: 1) без добавления факторов роста (контроль); 2) с добавлением EGF и 3) с добавлением GM-CSF.

При сокультивировании эмбрионов мышей (ICR и HT1AN/Icgn) были сформированы две тестовые группы: 1) 4-клеточные эмбрионы HT1AN/Icgn в качестве контроля (HT1AN/Icgn); 2) 4-клеточные эмбрионы HT1AN/Icgn совместно с морулами линии ICR (ICR + HT1AN/Icgn).

Культивирование производили под минеральным маслом (Sigma, США) в течение 24 ч (для мышей) и 72 ч (для крыс) при 37 °C в 5 % CO₂ и влажности 90 % в CO₂ инкубаторе BINDER 150-UL (Германия). Жизнеспособность эмбрионов оценивали на микроскопе DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) с увеличением $\times 50$ и $\times 100$ и производили фотосъемку.

Статистический анализ

Результаты культивирования *in vitro*, а также сокультивирования сравнивали с использованием теста χ^2 . Результаты при $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Данные были проанализированы с использованием стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc).

Результаты

В ходе проделанной работы было установлено, что при культивировании *in vitro* преимплантационных зародышей мышей линии C57BL/6J-A^y в течение 24 ч наблюдается ускорение развития эмбрионов в группе с добавлением фактора роста GM-CSF (табл. 1). По общему числу развивающихся эмбрионов, т. е. достигших стадии морулы и бластоцисты, имеется достоверное отличие данной группы (94,4 %) от контроля (где развилось 28,6 % зародышей) и от группы с EGF (33,3 %). Следует отметить, что лишь

в группе, в которой эмбрионы мышей культивировали с GM-CSF, сформировались ранние бластоцисты (13 %); в двух других группах стадии бластоцисты не достиг ни один из эмбрионов.

Сходные результаты были получены при культивировании *in vitro* преимплантационных зародышей мышей линии HT1AC/Icgn (табл. 2). Все эмбрионы этой линии, культивировавшиеся с GM-CSF, развились (100 %), хотя бластоцист, так же как в других группах, не сформировалось. По общему числу развившихся эмбрионов имеется достоверное отличие данной группы от контроля.

Результаты длительного культивирования *in vitro* преимплантационных зародышей крыс линии OXYS/Icgn представлены в табл. 3. Стимулирующее действие на развитие эмбрионов оказывал EGF. В данной группе до стадии бластоцисты развилось 82,4 % эмбрионов. Имеется достоверное отличие данной группы от контроля, где до стадии бластоцисты развилось лишь 33,3 % всех зародышей.

При совместном культивировании 4-клеточных эмбрионов мышей линии HT1AN/Icgn с более поздними стадиями линии ICR наблюдается ускорение развития в экспериментальной группе по сравнению с контролем (табл. 4). Всего в группе по сокультивированию за 24 ч развилось 100 % всех эмбрионов до стадии морулы, но бластоцист ни в одной из групп не сформировалось. По общему числу развившихся эмбрионов имеется достоверное отличие экспериментальной группы от контроля.

Обсуждение

В данном исследовании был подтвержден стимулирующий эффект гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора по отношению к эмбрионам мышей, обнаруженный ранее (Robertson et al., 2001; Desai et al., 2007). При этом, однако, не было обнаружено стимулирующего эффекта эпидермального ростового фактора по отношению к эмбрионам мышей. В более ранних работах (Paria, Dey, 1990; Morita et al., 1994; Desai et al., 2007) было показано, что EGF влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов мышей в культуре *in vitro*, способствует формированию и росту внутренней клеточной массы (ВКМ) в бластоцисте, а также хэтчингу и имплантации эмбрионов. Отсутствие стимулирующего эффекта при применении EGF в нашей работе можно объяснить методическими различиями, такими как выбор дозы, длительность культивирования, а также среда, в которой культивировали зародыши.

Эффекты воздействия GM-CSF на преимплантационные эмбрионы крыс до нашей работы не изучались. В данном исследовании не обнаружено стимулирующего эффекта GM-CSF на эмбрионы крыс. Однако был обнаружен эффект ускорения образования бластоцист при воздействии другого фактора – EGF. Ранее было продемонстрировано, что добавление в среду культивирования этого фактора в той же дозе позитивно влияет на имплантацию эмбрионов крыс (Aflalo et al., 2007).

Известно, что у разных видов млекопитающих имеются различия в скорости формирования рецепторов к разным факторам роста (Hardy, Spanos, 2002). Именно с этим обстоятельством можно связать то, что в случае крыс

Таблица 1. Культивирование *in vitro* эмбрионов мышей линии C57BL/6J-A^y на стадии 8 бластомеров с факторами роста (EGF или GM-CSF)^а

Среда	Число эмбрионов		Развивающиеся эмбрионы, %		
	замороженно-оттаянных (число тестов)	поставленных на культуру	морулы	бластоцисты	общее
R1ECM (контроль) ^б	15 (3)	14	4 (28,6)	0 (0)	4 (28,6)
R1ECM + EGF ^в	14 (3)	9	3 (33,3)	0 (0)	3 (33,3)
R1ECM + GM-CSF ^г	56 (3)	54	44 (81,5)*	7 (13,0)	51 (94,4)**

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ – группа R1ECM + GM-CSF по сравнению с двумя другими группами в данной категории (общее число развивающихся зародышей); ^а – общий срок культивирования зародышей *in vitro* составлял 24 ч; ^б – R1ECM (контроль) – эмбрионы развивались в среде R1ECM (Rat 1-cell Embryo Culture Medium) без добавления факторов роста; ^в – R1ECM + EGF – эмбрионы развивались в среде R1ECM с добавлением эпидермального фактора роста (EGF); ^г – R1ECM + GM-CSF – эмбрионы развивались в среде R1ECM с добавлением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора роста (GM-CSF).

Таблица 2. Культивирование *in vitro* эмбрионов мышей линии HT1AC/Icgn на стадии 8 бластомеров с факторами роста (EGF или GM-CSF)^а

Среда	Число эмбрионов		Развивающиеся эмбрионы, %		
	замороженно-оттаянных (число тестов)	поставленных на культуру	морулы	бластоцисты	общее
R1ECM (контроль) ^б	22 (3)	18	13 (72,2)	0 (0)	13 (72,2)
R1ECM + EGF ^в	52 (3)	25	23 (92)	0 (0)	23 (92)
R1ECM + GM-CSF ^г	57 (3)	23	23 (100)*	0 (0)	23 (100)*

* $p < 0,05$ – группа R1ECM + GM-CSF по сравнению с контролем в данной категории (общее число развивающихся зародышей); ^{а, б, в, г} – см. в табл. 1.

Таблица 3. Культивирование *in vitro* эмбрионов крыс линии OXYS/Icgn на стадии 2–4 бластомеров с факторами роста (EGF или GM-CSF)^а

Среда	Число эмбрионов		Развивающиеся эмбрионы, %		
	замороженно-оттаянных (число тестов)	поставленных на культуру	морулы	бластоцисты	общее
R1ECM (контроль) ^б	18 (4)	15	5 (33,3)	5 (33,3)	10 (66,7)
R1ECM + EGF ^в	18 (4)	17	2 (11,8)	14 (82,4)*	16 (94,1)
R1ECM + GM-CSF ^г	17 (4)	15	2 (13,3)	10 (66,7)	12 (80,0)

* $p < 0,01$ – группа R1ECM + EGF по сравнению с контролем в данной категории (число зародышей достигших стадии бластоцисты); ^а – общий срок культивирования зародышей *in vitro* составлял 72 ч; ^б – R1ECM (контроль) – эмбрионы развивались в среде R1ECM (Rat 1-Cell Embryo Culture Medium) без добавления факторов роста; ^в – R1ECM + EGF – эмбрионы развивались в среде R1ECM с добавлением эпидермального фактора роста (EGF); ^г – R1ECM + GM-CSF – эмбрионы развивались в среде R1ECM с добавлением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора роста (GM-CSF).

Таблица 4. Сокультивирование *in vitro* эмбрионов мышей линии ICR и HT1AN/Icgn^а

Группа	Число эмбрионов		Развивающиеся эмбрионы, %		
	замороженно-оттаянных (число тестов)	поставленных на культуру	морулы	бластоцисты	общее
HT1AN/Icgn (контроль) ^б	15 (3)	13	8 (62,0)	0 (0)	8 (62,0)
ICR + HT1AN/Icgn ^г	15 (3)	12	12 (100)*	0 (0)	12 (100)*

* $p < 0,05$ – достоверность отличий от группы HT1AN/Icgn (контроль в данной категории (число морул; общее число развивающихся зародышей); ^а – общий срок культивирования зародышей *in vitro* составлял 24 ч; ^б – HT1AN/Icgn (контроль): 4-клеточные эмбрионы мышей линии HT1AN/Icgn развивались в среде R1ECM (Rat 1-cell Embryo Culture Medium); ^в – ICR + HT1AN/Icgn – 4-клеточные эмбрионы мышей линии HT1AN/Icgn совместно с морулами линии ICR развивались в среде R1ECM.

стимулирующий эффект был показан при добавлении в культуральную среду EGF, а в случае мышей – при добавлении GM-CSF. Другим объяснением могут быть различия оптимальной дозировки по каждому из изученных факторов для изучаемых видов грызунов. Известно, что GM-CSF в оптимальной дозе стимулирует развитие эмбрионов мышей, однако при пониженной или завышенной концентрации данного фактора стимулирующего эффекта не наблюдали (Elaimi et al., 2012).

В клиниках ВРТ (вспомогательных репродуктивных технологий) современным трендом является культивирование полученных в результате ЭКО эмбрионов до blastocysts перед их трансплантацией реципиентам (Blake et al., 2007). Показано, что условия культивирования сильно влияют на процент развития зародышей до blastocysts, формирование ВКМ, хэтчинг и другие аспекты развития (Sjöblom et al., 1999). Продемонстрированный нами эффект и сама модель могут быть в перспективе полезными для усовершенствования системы культивирования в клиниках ЭКО. Ранее было показано, что скорость развития эмбрионов в культуре *in vitro* зависит от числа эмбрионов в группе (Paria, Dey, 1990). Однако при числе эмбрионов в группе не менее 5 дальнейшее его возрастание не приводило к увеличению скорости их развития. В нашем исследовании группы состояли из 4–5 культивируемых зародышей (т. е. являлись оптимальными). При этом был показан дополнительный стимулирующий эффект по отношению к ранним стадиям дробления мышинных зародышей при их сокультивировании с более поздними стадиями (морулы). Таким образом, данная модель может иметь практическую ценность как инструмент в работе с эмбрионами млекопитающих для оптимизации их развития в культуре.

В исследованиях на мышах обнаружено, что после культивирования эмбрионов *in vitro* и последующей трансплантации эмбрионов меняются поведение (Ecker et al., 2004), а также некоторые физиологические характеристики, такие как вес (Sjöblom et al., 2005) и кровяное давление (Watkins et al., 2007). Можно предположить, что путем совместного культивирования эмбрионов разных линий или видов можно не только улучшать эффективность культуральных работ, но и влиять на характеристики потомков.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа выполнена на базе вивариев ИЦиГ СО РАН при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ № 15-04-05509.

Авторы выражают благодарность Елене Алексеевне Галустьян за помощь в работе с эмбрионами, а также ЦКП «Виварий конвенциональных животных» и «SPF-виварий».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Амстиславский С.Я., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Роговая А.А., Рагаева Д.С., Напримеров В.А., Литвинова Е.А., Плюснина И.Ф., Маркель А.Л. Редеривация путем трансплантации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(1):147-161.
- Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Амстиславский С.Я. Традиционные и современные подходы к культивированию преимплантационных эмбрионов млекопитающих *in vitro*. Онтогенез. 2014;45(2):73-88.
- Aflalo E.D., Sod-Moriah U.A., Potashnik G., Har-Vardi I. EGF increases expression and activity of PAs in preimplantation rat embryos and their implantation rate. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2007;5:4. DOI: 10.1186/1477-7827-5-4
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Igonina T., Abramova T., Rozhkova I. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*). *Theriogenology*. 2015;82:1056-1063. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.013
- Blake D., Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007;4:1-61. DOI: 10.1002/14651858.CD002118.pub3
- Brigstock D.R., Heap R.B., Brown K.D. Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. *J. Reprod. Fertil.* 1989;85:747-758. DOI: 10.1530/jrf.0.0850747
- Desai N., Kattal N., AbdelHafez F.F., Szeptycki-Lawson J., Goldfarb J. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and co-culture can affect post-thaw development and apoptosis in cryopreserved embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007;24(6):215-222. DOI: 10.1007/s10815-007-9119-8
- Ecker D.J., Stein P., Xu Z., Williams C.J., Kopf G.S., Bilker W.B., Abel T., Schultz R.M. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101(6):1595-1600. DOI: 10.1073/pnas.0306846101
- Elaimi A., Gardner K., Kistnareddy K., Harper J. The effect of GM-CSF on development and aneuploidy in murine blastocysts. *Hum. Reprod.* 2012;27(6):1590-1595. DOI: 10.1093/humrep/des108
- Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramanel J., Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum. Reprod.* 2000;4:905-910. DOI: 10.1093/humrep/15.4.905
- Hardy K., Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J. Endocrinol.* 2002;172(2):221-236. DOI: 10.1677/joe.0.1720221
- Morita Y., Tsutsumi O., Taketani Y. *In vitro* treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increases the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994;171(2):406-409.
- Paria B.C., Dey S.K. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990;87(12):4756-4760.
- Renard J.P., Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *J. Exp. Zool.* 1984;230:443-448. DOI: 10.1002/jez.1402300313
- Robertson S.A., Sjöblom C., Jasper M.J., Norman R.J., Seamark R.F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 2001;64(4):1206-1215. DOI: 10.1095/biol-reprod64.4.1206

- Sjöblom C., Roberts C.T., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology*. 2005;146(5):2142-2153. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-1260>
- Sjöblom C., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro*. *Hum. Reprod.* 1999;14(12):3069-3076. DOI: 10.1093/humrep/14.12.3069
- Spindler R.E., Crichton E.G., Agca Y., Loskutoff N., Critser J., Gardner D.K., Wildt D.E. Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. *Theriogenology*. 2006;66(1):82-92. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.021
- Spindler R.E., Wildt D.E. Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture. *Biol. Reprod.* 2002;66(1):167-173. DOI: 10.1095/biolreprod66.1.167
- Watkins A., Platt D. Mouse embryo culture induces changes in post-natal phenotype including raised systolic blood pressure. *PNAS*. 2007;104(13):5449-5454. DOI: 10.1073/pnas.0610317104
- Ziebe S., Loft A., Povlsen B.B., Erb K., Agerholm I., Aasted M., Gabrielsen A., Hnida C., Zobel D.P., Munding B., Bendz S.H., Robertson S.A. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 2013;99(6):1600-1609. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.043

Сравнение различных сочетаний криопротекторов и методов оттаивания при криоконсервации эмбрионов мышей и крыс

Т.Н. Игоина, Е.Ю. Брусенцев, И.Н. Рожкова, В.А. Напримеров, С.Я. Амстиславский

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

Выбор криопротектора, способа оттаивания эмбрионов влияет на эффективность процесса криоконсервации. Способ замораживания и оттаивания эмбрионов, нацеленный на сохранение blastomeres, был подобран на мышах линии ICR. В работе получали эмбрионы мышей линии ICR, а также крыс линий GC и OXYS на стадии дробящихся зародышей на третий день после спаривания и производили их замораживание по стандартной программе в пластиковых соломинах. На мышах ICR сравнивали влияние проникающих (этиленгликоль, глицерин) и не проникающих (сахароза) криопротекторов в их комбинации на выживание эмбрионов после замораживания. В этом же эксперименте сравнивали более быстрый (10 с на водяной бане при 37 °C) и более медленный (40 с при комнатной температуре, затем 40 с на водяной бане при 30 °C) способы оттаивания зародышей. Жизнеспособность эмбрионов мышей и крыс после процедур криоконсервации оценивалась путем их культивирования *in vitro*. Наши данные, полученные на мышах, свидетельствуют о том, что «медленное» оттаивание лучше подходит для выживания эмбрионов, чем «быстрое» оттаивание; добавление сахарозы к основному криопротектору (этиленгликолю или глицерину) улучшает показатели развития эмбрионов *in vitro* после оттаивания, особенно когда криопротектором является глицерин. Именно этот способ замораживания – оттаивания эмбрионов (глицерин с сахарозой в качестве криопротекторов, «медленное» оттаивание) был использован при работе с крысами линий GC и OXYS, при этом 68–83,3 % всех зародышей успешно пережили криоконсервацию, из них 64,7–66,6 % – успешно развивались в культуре.

Ключевые слова: мыши ICR; крысы GC; OXYS; криоконсервация эмбрионов; этиленгликоль; глицерин; сахароза.

A comparison of different cryoprotectant solutions and thawing methods for cryopreservation of embryos of mice and rats

T.N. Igonina, E.Yu. Brusentsev, I.N. Rozhkova, V.A. Naprimerov, S.Ya. Amstislavsky

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The proper choice of cryoprotectant and thawing method affects cryopreservation efficiency. A freezing-thawing method for sparing embryonic cells was evaluated in experiments with ICR mice. Cleavage-stage embryos of ICR mice, GC rats, and OXYS rats were collected on Day 3 of pregnancy and frozen in plastic straws according to a standard protocol. Permeating (ethylene glycol and glycerol) and nonpermeating (sucrose) cryoprotectants and their combinations were compared during the freezing of ICR mouse embryos. With these mice, two thawing methods were compared: rapid (water bath, 10 s, 37 °C) and slow (40 s, room temperature; 40 s, 30 °C). Embryo viability in mice and rats was evaluated by their *in vitro* culturing after thawing. Our data on mice indicate that slow thawing is more suitable for sparing the integrity of embryonic cells; moreover, supplementation of the main cryoprotectant (either ethylene glycol or glycerol) with sucrose is beneficial for subsequent *in vitro* culture, especially in the case of glycerol. This freezing-thawing protocol (with glycerol and sucrose as cryoprotectant agents and slow thawing) was applied to rats of the GC and OXYS strains; the survival rate after cryopreservation was 68–83.3 %, and the rate of *in vitro* development was 64.7–66.6 %.

Key words: ICR mice; GC rats; OXYS rats; embryo cryopreservation; ethylene glycol; glycerol; sucrose.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Игоина Т.Н., Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Сравнение различных сочетаний криопротекторов и методов оттаивания при криоконсервации эмбрионов мышей и крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):378-382. DOI 10.18699/VJ15.047

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Igonina T.N., Brusentsev E.Yu., Rozhkova I.N., Naprimerov V.A., Amstislavsky S.Ya. A comparison of different cryoprotectant solutions and thawing methods for cryopreservation of embryos of mice and rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):378-382. DOI 10.18699/VJ15.047

DOI 10.18699/VJ15.047

УДК 573.7:575:591.3

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

Принята к публикации 10.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Число линий мышей и крыс за последние десятилетия резко возросло (Abbott, 2004; Lasar et al., 2005). Из-за ограниченности ресурсов и повышенных требований к качеству животных для современных биомедицинских исследований работы по редеривации и криоконсервации эмбрионов мышей и крыс находятся в центре внимания современных генетических центров (Rall et al., 2000; Брусенцев и др., 2011; Амстиславский и др., 2013).

Целостность прозрачной оболочки – *zona pellucida* (ZP) – является важным элементом редеривации (Брусенцев и др., 2011; Рожкова и др., 2012; Амстиславский и др., 2013). ZP должна быть неповрежденной, так как считается, что она выступает в качестве эффективного естественного барьера против вирусных и бактериальных инфекций (Van Soom et al., 2010). Программа редеривации часто основана на сочетании трансплантации и криоконсервации эмбрионов (Morrell, 1999; Амстиславский и др., 2013).

Целью работы был поиск способов замораживания и оттаивания, направленных на максимальную целостность эмбрионов мышей и крыс. В частности, было произведено: 1) сравнение воздействия глицерина (Гли) и этиленгликоля (ЭГ) при замораживании эмбрионов, а также эффектов добавления сахарозы к этим основным криопротекторам; 2) сравнение влияния двух способов оттаивания («быстрого» и «медленного») на жизнеспособность эмбрионов мыши *in vitro*; 3) применение наиболее эффективного протокола по отношению к эмбрионам крыс линий GC и OXYS.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок мышей линии ICR (возраст 8–10 нед, $n = 54$), а также половозрелых самок крыс линий GC (возраст 10–14 нед, $n = 8$) и OXYS (возраст 10–14 нед, $n = 4$). Для получения эмбрионов самок мышей и крыс спаривали с самцами тех же линий того же возраста. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Все эксперименты на животных были одобрены комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

Получение преимплантационных эмбрионов мышей и крыс

Мыши. У самок мышей линии ICR вызывали суперовуляцию по стандартной схеме, описанной ранее (Амстиславский, 2006). Каждую суперовулирующую самку затем ссаживали на ночь с самцом линии ICR. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности.

Крысы. Самок крыс линий GC и OXYS в состоянии эструса, определенного путем исследования влагалищных мазков, ссаживали на ночь с самцами той же линии. День обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке считали первым днем беременности.

Самок мышей и крыс подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков на третий день беременности. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой EMCARE Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, США), как описано ранее (Амстиславский и др., 2013). Эмбрионы подсчитывали и оценивали с использованием стереомикроскопа Leica S8 APO с увеличением до $\times 80$ (Leica Microsystems, Германия). Качество эмбрионов оценивали с использованием хорошо известных критериев: стадия эмбрионального развития и целостность ZP (Rulicke, Autenried, 1995; Van Soom et al., 2010); число жизнеспособных клеток (Emiliani et al., 2000). Некачественные эмбрионы отбраковывали, эмбрионы хорошего качества промывали в трех каплях той же среды и либо замораживали, как описано ниже, либо использовали свежими как контроль.

Замораживание эмбрионов

В экспериментах с эмбрионами мышей (линии ICR) использовали четыре комбинации криопротекторов: 1,5 М этиленгликоль (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) с добавлением сахарозы или без добавления; 10 % v/v глицерин (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) с добавлением 0,1 М сахарозы (Sigma, США) или без добавления.

В экспериментах с эмбрионами крыс (линии GC и OXYS) применяли лишь один вариант замораживания из описанных выше, а именно: глицерин (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) с добавлением 0,1 М сахарозы (Sigma, США).

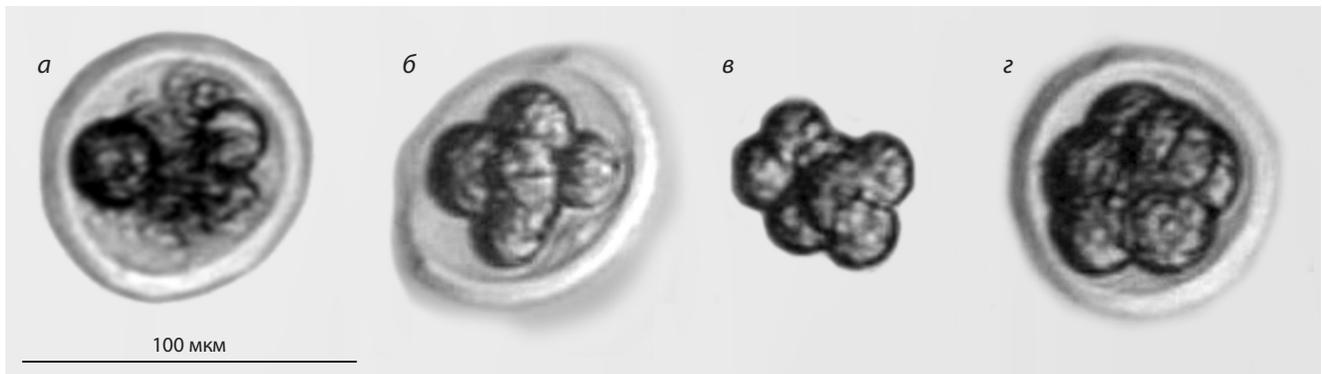
После добавления в раствор соответствующей криопротективной смеси 10–15 эмбрионов помещали в пластиковые соломины вместимостью 0,25 мл (Cryo Bio System, Франция), каждая из которых была заполнена тремя порциями криопротектора, разделенными двумя воздушными пузырьками, центральная часть содержала эмбрионы.

Соломины с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL 8800 (CryoLogic, Австралия), охлаждали в соответствии со следующей программой: от 18 °C до –7 °C со скоростью –1 °C/мин; 10 мин при –7 °C; сидинг через 1 мин; от –7 °C до –35 °C со скоростью –0,3 °C/мин; 10 мин при –35 °C – и погружали в жидкий азот при этой температуре.

Оттаивание эмбрионов

По отношению к эмбрионам мышей применяли два способа оттаивания – «медленный» и «быстрый». При «медленном» оттаивании соломины доставали из резервуара с жидким азотом, выдерживали в течение 40 с при комнатной температуре, а затем помещали на 40 с в водяную баню при 30,0 °C. Ранее было показано, что скорость оттаивания с использованием этого метода составляет около 300 °C/мин (Renard, Babinet, 1984). Этот метод был применен к эмбрионам, замороженным с использованием каждого из четырех вариантов криопротекции (этиленгликоль, глицерин, этиленгликоль и сахароза, глицерин и сахароза).

При быстром способе оттаивания соломины выдерживали в течение 10 с на водяной бане при 37 °C. Ранее было продемонстрировано, что скорость оттаивания с ис-



Преимплантационные эмбрионы мышей ICR после замораживания с глицерином (10 %) и оттаивания в течение 10 с при 37 °С. а – мертвый; б – с поврежденной ZP; в – полностью лишенный ZP; з – успешно переживший криоконсервацию. Масштабная линейка = 100 мкм.

пользованием этого метода составляет около 2500 °С/мин (Renard, Babinet, 1984). Этот метод был применен лишь по отношению к эмбрионам, замороженным с этиленгликолем или глицерином (без сахарозы).

Для размораживания эмбрионов крыс, предварительно замороженных в присутствии комбинации криопротекторов (глицерина и сахарозы), применяли лишь первый способ.

Отмывание и культивирование эмбрионов

После оттаивания всю жидкость, содержащуюся в солоmine, выдавливали на 35 мм чашки Петри (Corning, США). Криопротектор удаляли при помощи промывания размороженных эмбрионов; методы отмывания варьировали в зависимости от того, какой был использован криопротектор.

Эмбрионы, замороженные с этиленгликолем, после их размораживания промывали три раза в свежих каплях (90 мкл, по 6–7 мин в каждой капле) среды Holding Solution (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) при 37 °С.

Для размораживания эмбрионов, замороженных с глицерином, использовали специальную систему, предлагаемую фирмой «Thawing System» (EMCARE, ICPBio Reproduction, США). Эта система представляет собой три раствора с понижающейся концентрацией глицерина. Перенос эмбрионов из одной капли этих растворов в другую осуществляли при 37 °С.

После замораживания эмбрионов с комбинацией криопротекторов (этиленгликоль и сахароза или глицерин и сахароза) содержимое соломины выдавливали на чашку Петри и выдерживали в этой смешанной капле в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем эмбрионы переносили в свежую каплю среды Holding Solution (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) и инкубировали в течение 15 мин при 37 °С.

После удаления криопротектора, как описано выше, эмбрионы, независимо от их качества, последовательно промывали в десяти каплях среды Holding Solution (200 мкл EMCARE, ICPBio Reproduction, США) со сменой стеклянных капилляров для стерильного переноса между каплями и оценивали визуально при помощи микроскопа M205 FA (Leica Microsystems, ×230). Эмбрионы, у ко-

торых было разрушено более 25 % бластомеров и/или имелись нарушения прозрачной оболочки, отбраковывали, остальные ставили на культивирование *in vitro*. Эмбрионы мышей переносили в 50 мкл среды M16 (Sigma, США), а эмбрионы крыс – в 50 мкл среды R1ECM (Amstislavsky et al., 2015) и культивировали в течение 48 ч под минеральным маслом (Sigma, США) при 37 °С в 5 %-й CO₂ и влажности 90 % в CO₂-инкубаторе BINDER 150-UL (Германия). Свежие эмбрионы хорошего качества извлекали из мышей-доноров и осуществляли процедуры с ними, как описано выше, но без замораживания–оттаивания; эмбрионы, не подвергавшиеся криоконсервации, использовали в качестве контроля. Жизнеспособность эмбрионов оценивали по их развитию *in vitro*.

Статистический анализ

Все результаты, в том числе процент развивающихся в культуре эмбрионов, представлены в виде Mean ± S.E.M. Результаты воздействия на эмбрионы процедур криоконсервации оценивали по проценту развивающихся в культуре *in vitro* эмбрионов после их оттаивания посредством дисперсионного анализа (ANOVA) и post-hoc сравнений по тесту Ньюмена–Кейлса, а также *t* – критерию Стьюдента. В качестве факторов были взяты: основной криопротектор (этиленгликоль/глицерин), способ оттаивания («медленный»/«быстрый»), добавление сахарозы (присутствие/отсутствие). Результаты при *p* < 0,05 считали статистически значимыми. Данные были проанализированы с использованием стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc).

Результаты

После оттаивания эмбрионов мышей при помощи световой микроскопии выявлялись следующие типичные нарушения: наличие в эмбрионе разрушенных бластомеров (рисунок, а), повреждения прозрачной оболочки (рисунок, б), полное отсутствие прозрачной оболочки (рисунок, в). Успешно пережившими криоконсервацию мы считали лишь те эмбрионы, у которых такие повреждения отсутствовали (рисунок, з).

Влияние факторов «основной криопротектор» (этиленгликоль/глицерин), «режим оттаивания» («медленное»/

Развитие *in vitro* (M ± SEM) замороженно-оттаянных эмбрионов мышей линии ICR

Группы	Число испытаний (общее число свежих/оттаянных эмбрионов)	Число свежих/оттаянных эмбрионов	Число бластоцист	Развитие, %
Свежие эмбрионы (контроль)	3 (21)	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	100
Этиленгликоль, «быстрое» оттаивание	5 (80)	16,0 ± 4,0	11,2 ± 2,6	71,2 ± 6,1*
Этиленгликоль, «медленное» оттаивание	2 (28)	14,0 ± 1,0	10,0 ± 2,0	71,0 ± 9,0*
Этиленгликоль и сахароза, «медленное» оттаивание	3 (20)	6,7 ± 0,3	6,0 ± 0,6	90,5 ± 9,5
Глицерин, «быстрое» оттаивание	3 (38)	12,7 ± 1,5	3,3 ± 0,9	25,3 ± 3,9#
Глицерин, «медленное» оттаивание	15 (273)	18,2 ± 2,3	14,7 ± 1,7	82,8 ± 3,4*
Глицерин и сахароза, «медленное» оттаивание	3 (29)	9,7 ± 3,3	9,3 ± 0,3	96,7 ± 3,3

* $p < 0,05$ по сравнению с развитием свежих эмбрионов; # $p < 0,001$ по сравнению с развитием эмбрионов во всех других группах.

«быстрое») и «сахароза» (с сахарозой/без сахарозы) были изучены на эмбрионах мышей стадии 4–8 клеток. Эти результаты приведены в таблице. Статистический анализ, проведенный методом ANOVA, показал, что произошло существенное воздействие факторов «основной криопротектор» ($F_{(1,25)} = 5,25; p < 0,05$) и «режим оттаивания» ($F_{(1,25)} = 18,56; p < 0,001$) на скорость развития эмбрионов после замораживания/оттаивания. Наблюдалось и взаимодействие между этими факторами ($F_{(1,25)} = 18,82; p < 0,001$). Добавление сахарозы к основному криопротектору позволило добиться более высоких темпов развития оттаявших эмбрионов в культуре *in vitro* ($F_{(1,25)} = 5,56; p < 0,05$).

В дальнейших исследованиях на крысах был применен лишь один способ замораживания и оттаивания (комбинация глицерина с сахарозой в качестве криопротекторов и «медленное» оттаивание). Из 75 двух- четырехклеточных эмбрионов крыс линии GC, подвергнутых криоконсервации, после оттаивания по визуальным оценкам после исследования при помощи световой микроскопии 51 эмбрион (68 %) соответствовал критериям жизнеспособности и был поставлен на культивирование *in vitro*. Из них 30 эмбрионов (58,8 %) достигали стадии морулы и 3 (5,9 %) – стадии бластоцисты в течение 48 ч культивирования. Таким образом, 64,7 % от общего числа эмбрионов успешно развивались *in vitro*. Из 18 двух- четырехклеточных эмбрионов крыс линии OXYS, подвергнутых криоконсервации, после оттаивания по визуальным оценкам после исследования при помощи световой микроскопии 15 эмбрионов (83,3 %) соответствовали критериям жизнеспособности и были поставлены на культивирование *in vitro*. Из них 8 (53,3 %) достигали стадии морулы и 2 (13,3 %) – стадии бластоцисты в течение 48 ч культивирования. Таким образом, 66,6 % от общего числа эмбрионов крыс линии OXYS, поставленных на культуру после процедур криоконсервации, успешно развивались *in vitro*.

Обсуждение

Результаты культивирования *in vitro* эмбрионов мышей, представленные в данном исследовании, показывают, что

при использовании как этиленгликоля, так и глицерина в качестве основного криопротектора добавление сахарозы при работе в режиме «медленного» оттаивания приводит к тому, что процент развивающихся эмбрионов не отличается от такового в контроле. Целостность бластомеров и прозрачной оболочки зародышей является важным условием для успешной редеривации (Van Soom et al., 2010; Брусенцев и др., 2011; Рожкова и др., 2012). Наши результаты, полученные на мышах, показывают, что «медленное» оттаивание и присутствие в криопротективной смеси наряду с основным (проникающим) дополнителем (непроникающего) криопротектора способствует сохранности бластомеров и зародышей в целом. Наше исследование свидетельствует о том, что из всех использованных протоколов именно этот в наибольшей мере является протоколом выбора, если замораживание/оттаивание является частью процесса редеривации.

Более того, выяснилось, что, когда криопротектором является глицерин, сохранение жизнеспособности эмбрионов после процедур криоконсервации в значительной степени зависит от режима оттаивания. Наши данные свидетельствуют о том, что, когда оттаивание происходит «быстро», процент развития в культуре эмбрионов, замороженных с глицерином, оказывается самым низким. В противоположность этому, эмбрионы, замороженные с глицерином, имеют более высокие показатели развития в культуре, когда используется «медленное» оттаивание.

Результаты исследований на крысах линий GC и OXYS подтвердили, что при применении «медленного» оттаивания и добавлении сахарозы к основному криопротектору (в случае с крысами в качестве основного криопротектора мы использовали лишь глицерин) процент эмбрионов, успешно переживших криоконсервацию, был не менее 66 %, из них *in vitro* развивалось не менее 64 %. Имеется лишь несколько работ, в которых описан процесс замораживания эмбрионов крыс программным способом, сходным с тем, что использовался в нашей работе (Rall et al., 2000; Pfaff et al., 2000). Процент успешно переживших криоконсервацию зародышей крыс линий GC и OXYS при использовании оптимального протокола, выбранного на

основании исследований на мышах (глицерин с сахарозой в качестве криопротекторов и «медленное» оттаивание), был сопоставим с таковым в цитируемых работах.

Глицерин и этиленгликоль часто используются в качестве криопротекторов для замораживания эмбрионов мышей и крыс (Morrell, 1999; Emiliani et al., 2000; Pfaff et al., 2000; Rall et al., 2000), однако каждое из этих химических веществ обладает некоторыми индивидуальными свойствами. Следует отметить, что скорость проникновения глицерина в зародышевые клетки ниже, чем у этиленгликоля (Pedro et al., 2005). **Результаты нашего теста** с культивированием *in vitro* эмбрионов мышей показывают, что эффективность использования этиленгликоля или глицерина в качестве криопротектора сопоставима, но только в тех случаях, когда применяется «медленный» режим оттаивания. Наши результаты хорошо согласуются с результатами других исследований на грызунах (Renard, Babinet, 1984; Ridha, Dukelow, 1985), свидетельствующих о том, что использование глицерина и этиленгликоля требует относительно медленного оттаивания.

Сахароза выступает в качестве осмотического буфера, который уменьшает осмотический шок бластомеров после оттаивания (McWilliams et al., 1995). В соответствии с этим самые высокие показатели развития эмбрионов в культуре наблюдались лишь в тех группах, где к основному криопротектору была добавлена сахароза.

Среда R1ECM была создана специально для культивирования эмбрионов крыс (Miyoshi et al., 1995) и в настоящее время успешно применяется на других видах грызунов (Amstislavsky et al., 2015). В данном исследовании эта среда впервые была успешно применена с целью культивирования *in vitro* дробящихся эмбрионов крыс линий GC и OXYS после их замораживания и оттаивания.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа выполнена на базе вивариев ИЦиГ СО РАН при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ № 15-04-05509. Авторы выражают благодарность Галустян Елене Алексеевне за помощь в работе с эмбрионами мышей и крыс.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Амстиславский С.Я. Эмбриотехнологические подходы к сохранению исчезающих видов млекопитающих. Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2006.
Амстиславский С.Я., Иголина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Роговая А.А., Рагаева Д.С., Напримеров В.А., Литвинова Е.А., Плюснина И.Ф., Маркель А.Л. Редеривация путем трансплантации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(1):147-161.

Брусенцев Е.Ю., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Редеривация как способ очистки лабораторных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(1):102-113.
Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Оболочки преимплантационных зародышей млекопитающих как мишень репродуктивных технологий. Онтогенез. 2012;43(5):1-11.
Abbott A. Geneticists prepare for deluge of mutant mice. Nature. 2004; 432:541. DOI: 10.1038/432541a
Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Igonina T., Abramova T., Rozhkova I. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*). Theriogenology. 2015;82:1056-1063. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.013
Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramanel J., Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum. Reprod. 2000;4:905-910. DOI: 10.1093/humrep/15.4.905
Lasar J., Moreno C., Jacob H., Kwitek A. Impact of genomics on research in rats. Genome Res. 2005;15:1717-1728. DOI: 10.1101/gr.3744005
McWilliams R.B., Gibbons W., Leibo S. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. Hum. Reprod. 1995;10:1163-1171. DOI: 10.5.1163
Miyoshi K., Abeysdeera L.R., Okuda K., Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. J. Reprod. Fertil. 1995;103(1):27-32. DOI: 10.1530/jrf.0.1030027
Morrell J.M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice. Lab. Anim. 1999;33:201-206. DOI: 10.1258/002367799780578165
Pedro P.B., Yokoyama E., Zhu S.E., Yoshida N., Valdez D.M. Jr., Tanaka M., Edashige K., Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. J. Reprod. Dev. 2005;2:235-246. DOI: 10.1262/jrd.16079
Pfaff R.T., Agca Y., Liu J., Woods E.J., Peter A.T., Critser J.K. Cryobiology of rat embryos I: determination of zygote membrane permeability coefficients for water and cryoprotectants, their activation energies, and the development of improved cryopreservation methods. Biol. Reprod. 2000;63:1294-1302. DOI: 10.1095/biolreprod63.5.1294
Rall W.F., Schmidt P.M., Lin X., Brown S.S., Ward A.C., Hansen C.T. Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. ILAR J. 2000;41:221-227. DOI: 10.1093/ilar.41.4.221
Renard J.P., Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. J. Exp. Zool. 1984;230:443-448. DOI: 10.1002/jez.1402300313
Ridha M.T., Dukelow W.R. The developmental potential of frozen-thawed hamster preimplantation embryos following embryo transfer: viability of slowly frozen embryos following slow and rapid thawing. Anim. Reprod. Sci. 1985;9:253-259. DOI: 10.1016/0378-4320(85)90008-9
Rulicke T., Autenried P. Potential of two-cell mouse embryos to develop to term despite partial damage after cryopreservation. Lab. Anim. 1995;29:320-326. DOI: 10.1258/002367795781088252
Van Soom A., Wrathall A.E., Herrler A., Nauwynck H.J. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? Reprod. Fertil. Dev. 2010;22:21-31. DOI: 10.1071/RD09230

Эффекты репродуктивных технологий и SPF-статуса на некоторые физиологические и поведенческие характеристики крыс с артериальной гипертензией (линия НИСАГ)

Д.С. Рагаева¹, Т.О. Абрамова¹, И.Н. Рожкова¹, Е.Ю. Брусенцев¹, Е.В. Калиниченко², Т.Н. Игонина¹, С.Я. Амстиславский¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Современные стандарты в исследованиях на лабораторных животных направлены на то, чтобы работать с лабораторными животными высокого качества, в частности со свободными от специфических патогенов (SPF) мышами и крысами. С другой стороны, вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) широко используются в современной медицине для лечения бесплодия человека, а также для создания криобанков генетических ресурсов. В данной работе проведено сравнение массы тела, артериального давления (АД) и поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) трех групп крыс линии НИСАГ (наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия): группа крыс, рожденных и выращенных в конвенциональном виварии, и двух групп из SPF-вивария (рожденных естественным путем и полученных путем применения репродуктивных технологий). Различий по величине АД между исследуемыми группами обнаружено не было, но выявлены различия в поведении крыс линии НИСАГ при разных условиях содержания. Время груминга, а также число актов дефекации и уринации за время теста было достоверно ниже у крыс обеих групп, родившихся в условиях SPF-вивария, по сравнению с крысами, рожденными в условиях конвенционального вивария. Поведение крыс линии НИСАГ, рожденных при помощи ВРТ, отличалось от поведения крыс линии НИСАГ, рожденных естественным путем. Тест ПКЛ выявил снижение тревожности у первых. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что как условия содержания, так и применение репродуктивных технологий влияют на поведение крыс линии НИСАГ, при этом гипертензия развивается во всех случаях.

Ключевые слова: крысы НИСАГ; артериальное давление; вспомогательные репродуктивные технологии; поведение.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Рагаева Д.С., Абрамова Т.О., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Калиниченко Е.В., Игонина Т.Н., Амстиславский С.Я. Эффекты репродуктивных технологий и SPF-статуса на некоторые физиологические и поведенческие характеристики крыс с артериальной гипертензией (линия НИСАГ). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):383-387. DOI 10.18699/VJ15.048

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Ragaeva D.S., Abramova T.O., Rozhkova I.N., Brusentsev E.Yu., Kalinichenko E.V., Igonina T.N., Amstislavsky S.Ya. Effects of reproductive technologies and SPF status on some physiological and behavioral characteristics in rats with arterial hypertension (ISIAH strain). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):383-387. DOI 10.18699/VJ15.048

DOI 10.18699/VJ15.048

УДК 573.7:575:591.3:592/599

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

Принята к публикации 10.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Effects of reproductive technologies and SPF status on some physiological and behavioral characteristics in rats with arterial hypertension (ISIAH strain)

D.S. Ragaeva¹, T.O. Abramova¹, I.N. Rozhkova¹, E.Yu. Brusentsev¹, E.V. Kalinichenko², T.N. Igonina¹, S.Ya. Amstislavsky¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Modern standards of Laboratory Animal Science include working with laboratory animals of high quality, in particular, with specific pathogen free (SPF) mice and rats. On the other hand, assisted reproductive technologies (ART) are widely used in modern medicine for human infertility treatment as well as for genome resource banking. In the present study, a comparison of body weight, blood pressure (BP) and behavior in the «elevated plus maze» (EPM) test was made between three groups of ISIAH (inherited stress induced arterial hypertension) rats: a group of animals that were born and raised in a conventional animal facility and two groups from an SPF animal facility (one with animals born naturally and another with animals resulting from ART). There were no changes in BP between the groups, but the behavior of ISIAH differed depending on rearing conditions. In particular, grooming time, as well as the number of defecations and the number of urinations during the test were decreased in both groups of ISIAH rats born in the SPF animal facility as compared to ISIAH rats born in the conventional animal facility. The behavior of the ISIAH rat offspring resulting from ART was different from that of the naturally born group: the EPM test revealed reduced anxiety in the former. The results of the present study indicate that the rearing conditions as well as reproductive technologies affect some behavioral characteristics in adult ISIAH rats, although they develop arterial hypertension in all the conditions used in this study.

Key words: ISIAH rats; blood pressure; assisted reproductive technologies; behavior.

Традиционно механизмы формирования артериальной гипертензии изучают преимущественно на специальных моделях, созданных на лабораторных животных, главным образом на гипертензивных линиях крыс (Рагаева и др., 2014). В ИЦиГ СО РАН путем селекции получена линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ), физиологические и поведенческие характеристики которой достаточно полно описаны (Маркель, 1981; Амстиславский, 2006; Рагаева и др., 2014). Однако до настоящего времени исследования проводили на крысах НИСАГ конвенционального статуса. Относительно недавно линия крыс НИСАГ была редеривирована и появилась в коллекции SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (Амстиславский и др., 2013).

Придание SPF-статуса животным позволяет получать более точные результаты исследований, а также уменьшить число экспериментальных животных в группах за счет уменьшения неконтролируемой изменчивости (Festing et al., 1998). В литературе, однако, имеются данные о том, что некоторые физиологические и биохимические характеристики экспериментальных животных, такие как содержание белка фактора роста нервов у мышей и некоторые другие, могут изменяться в зависимости от того, в каком виварии выращивают крыс: в SPF- или конвенциональном виварии (Tanaka, Matsuda, 2005). С другой стороны, вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), такие как культивирование *in vitro* в сочетании с трансплантацией и криоконсервацией эмбрионов, широко используют в медицине и биологической науке, но отдаленные эффекты по отношению к поведению и физиологическому статусу потомков изучены недостаточно (Рагаева и др., 2014).

Задачами данного исследования было сравнить (1) физиологические параметры (вес и кровяное давление) и (2) характеристики поведения у крыс НИСАГ трех различных групп: родившихся в конвенциональном виварии в результате естественного размножения; родившихся в SPF-виварии в результате естественного размножения; родившихся в SPF-виварии в результате ВРТ.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок крыс НИСАГ (возраст 10–14 нед). Для получения эмбрионов самок крыс спаривали с самцами тех же линий и того же возраста. Среднее значение артериального давления (АД) для самок – $159,5 \pm 1,1$; для самцов – $177,0 \pm 0,9$. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН при естественном освещении и свободном доступе к сбалансированному корму и воде.

Реципиентами для трансплантации эмбрионов крыс линии НИСАГ явились гибриды, полученные путем скрещивания двух инбредных нормотензивных линий крыс, Sprague-Dawley и ручных крыс-пасюков (Амстиславский и др., 2013). Животные-реципиенты содержались в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН при круглогодичных стандартных параметрах условий содержания в соответствии с требованиями GLP: комфортной температуре 22–24 °С,

свободном доступе к автоклавированному стандартному корму (V1534-300, Sniff, Soest, Германия) и очищенной воде, при режиме освещения 14 ч день / 10 ч ночь (Новосибирск, Россия).

Все эксперименты на животных были одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики (протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

Получение преимплантационных эмбрионов крыс

Проводили контролируемое спаривание самок-доноров НИСАГ с самцами той же линии. Определение фертильного спаривания проводили по наличию сперматозоидов в вагинальных мазках согласно стандартной методике (Амстиславский, 2006).

Самок крыс подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой EMCARE Complete Ultra Flushing Solution (ICPbio Reproduction, США), как описано ранее (Амстиславский и др., 2013). Для получения преимплантационных эмбрионов на ранних стадиях дробления (2–4 бластомера) эмбрионы вымывали через 72 ч после обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках самок крыс (3-й день беременности). Эмбрионы подсчитывали и оценивали с использованием микроскопа МБС-10 (Россия). Качество эмбрионов оценивали с использованием таких критериев, как стадия эмбрионального развития и целостность *zona pellucida* (ZP) (Van Soom et al., 2010); число жизнеспособных клеток (Emiliani et al., 2000). Некачественные эмбрионы отбраковывали, эмбрионы хорошего качества промывали в трех каплях среды EMCARE™ Holding Solution (ICPbio reproduction, США) и замораживали, как описано ниже.

Замораживание эмбрионов

После эквипирации в среде EMCARE™ Holding Solution (ICPbio reproduction, США) с криопротектором глицерином (10 % v/v глицерин (EMCARE, ICPbio Reproduction, США)) 10–15 эмбрионов помещали в пластиковые соломины вместимостью 0,25 мл (Cryo Bio System, Франция), каждая из которых была заполнена тремя порциями криопротектора, разделенными двумя воздушными пузырьками. Центральная часть содержала эмбрионы. Соломины с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL 8 800 (CryoLogic, Австралия), охлаждали в соответствии со следующей программой: от 18 °С до –7 °С со скоростью –1 °С/мин; 10 мин при –7 °С, сидинг через 1 мин; от –7 °С до –35 °С со скоростью –0,3 °С/мин; 10 мин при –35 °С – и погружали в жидкий азот при этой температуре.

Оттаивание, отмывание и культивирование эмбрионов

Эмбрионы крыс размораживали следующим способом: выдерживали в течение 40 с при комнатной температуре, а затем помещали на 40 с в водяную баню при 30,0 °С. После оттаивания содержимое соломины выдавливали на 35 мм чашки Петри (Corning, США), криопротектор удаляли с использованием специальной среды Thawing System (EMCARE, ICPbio Reproduction, США) при 37 °С.

Таблица 1. Масса тела и артериальное давление крыс исследуемых групп в возрасте 2 мес.

Группа (самцы)	Масса тела, г	Артериальное давление, мм рт. ст.
НИСАГ конвенциональные	231,0±8,2 (n = 5)	171,6±4,4 (n = 5)
НИСАГ SPF	258,0±4,5 (n = 10)*	165,0±5,5 (n = 10)
НИСАГ <i>in vitro</i>	251,7±15,8 (n = 7)	170,7±9,0 (n = 7)

В скобках указано число животных в исследуемых группах. * $p < 0,05$ по сравнению с конвенциональными животными. НИСАГ – линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. SPF (specified pathogen free) означает отсутствие видоспецифичных патогенных микроорганизмов.

После удаления криопротектора эмбрионы, независимо от их качества, последовательно промывали в десяти каплях стерильной среды Holding Solution (200 мкл EMCARE, ICPBio Reproduction, США) со сменой стеклянных капилляров для стерильного переноса между каплями и оценивали визуально при помощи микроскопа M205 FA (Leica Microsystems) при увеличении до $\times 230$. Эмбрионы, у которых было разрушено более 25 % blastomeres и/или имелись нарушения прозрачной оболочки, были отбракованы, остальные поставлены на культивирование *in vitro*.

Эмбрионы крыс переносили в ранее подготовленные и уравновешенные в условиях CO₂ инкубатора BINDER 150-UL (Германия) (5 % CO₂, 37 °C и 80 % влажности) капли объемом 50 мкл со средой для культивирования R1ECM (rat 1-cell culture medium) (Amstislavsky et al., 2015), покрывали минеральным маслом (Sigma, США) и культивировали в течение 48 ч. Каждые 24 ч оценивали стадию развития эмбрионов при помощи инвертированного микроскопа DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) с увеличением $\times 50$ и $\times 100$ и производили фотосъемку. Для трансплантации отбирали эмбрионы, достигшие стадии морулы или blastocysts в течение 48 ч культивирования.

Трансплантация эмбрионов самкам-реципиентам

Для трансплантации эмбрионов крыс использовали самок-реципиентов 3-го дня беременности (считая день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке 1-м днем). Операцию проводили по стандартной методике, описанной ранее (Амстиславский и др., 2013).

Методы исследования потомков

Исследования проводились на самцах из трех экспериментальных групп: НИСАГ из конвенционального вивария ($n = 5$), НИСАГ из SPF-вивария ($n = 10$) и НИСАГ *in vitro* – группа потомков, родившихся после культивирования эмбрионов *in vitro* и трансплантации ($n = 7$).

Взвешивание

Взвешивание животных производили в возрасте 2 мес. на весах ScoutPro SPS2001 F (Ohaus Corporation, США) с точностью измерений 0,1 г.

Измерение артериального давления

Измерение артериального давления производили у крыс в возрасте 2 мес. сфигмографическим методом при по-

мощи манжеты, надеваемой на хвост и соединенной с датчиком давления Elema Schonender EMT-510 (Швеция), согласно ранее описанной методике (Амстиславский, 2006).

Поведенческие тесты

Для тестирования поведения использовали «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Тест заключался в следующем: тестируемое животное помещали в лабиринт, состоящий из симметрично расположенных 2 закрытых и 2 открытых рукавов. В течение пятиминутного тестирования фиксировались следующие параметры поведения, являющиеся обязательными при проведении данного теста (Rodgers, Cole, 1994): общее число заходов в открытые и закрытые рукава; время, проведенное в открытых и закрытых рукавах. Дополнительно оценивали число заходов в центр установки, время пребывания в центре, число вертикальных стоек, время, проведенное в стойках, число мочевых меток и актов дефекации, а также число и продолжительность актов груминга.

Статистический анализ

Результаты исследования физиологических и поведенческих показателей сравнивали с использованием U-критерия Манна–Уитни. Результаты при $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Данные были проанализированы с использованием стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc).

Результаты

Сравнение физиологических характеристик, таких как масса тела и АД (табл. 1), показало, что у самцов НИСАГ масса тела в возрасте 2 мес. при содержании в SPF условиях достоверно выше, чем при содержании в конвенциональном виварии ($p < 0,05$). В то же время на такую характеристику, как АД, условия содержания не повлияли.

В табл. 2 приведены результаты тестирования поведения в тесте ПКЛ крыс линии НИСАГ, выращенных в условиях конвенционального и SPF-вивариев. Основные различия животных SPF-статуса (как группы рожденных после естественного спаривания, так и группы, полученной после применения репродуктивных технологий) заключались в уменьшении времени груминга ($p < 0,05$; $p < 0,01$). Следует особо обратить внимание, что при этом число актов груминга оставалось примерно одинаковым. У животных обеих групп, полученных в SPF-виварии, были также достоверно снижены показатели дефекации

Таблица 2. Поведение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» крыс исследуемых групп

Параметр	Группа крыс НИСАГ (самцы)		
	конвенциональные (n = 5)	SPF (n = 10)	<i>in vitro</i> (n = 7)
Общее число заходов в рукава	6,8 ± 2,0	6,7 ± 0,8	6,7 ± 0,5
Заходы в открытые рукава, %	38,7 ± 12,2	39,3 ± 1,4	47,2 ± 3,3
Время, проведенное в открытых рукавах, %	17,2 ± 6,4	17,5 ± 3,4	43,4 ± 8,6 [*]
Число вертикальных стоек (rearing)	11,4 ± 1,6	15,9 ± 1,8	9,7 ± 1,3
Время в стойках (rearing), с	23,0 ± 2,9	31,0 ± 3,6	20,8 ± 3,8
Число актов груминга	3,2 ± 0,8	2,8 ± 0,3	1,8 ± 0,4
Общее время груминга, с	61,2 ± 12,0 ^{*,**}	24,1 ± 3,8	23,1 ± 7,3
Число актов дефекации	5,4 ± 0,9 ^{##}	0	0,4 ± 0,3
Число актов урикации	12,2 ± 2,8 ^{##}	2,0 ± 0,4	3,6 ± 0,4

^{*} $p < 0,05$ по сравнению с НИСАГ SPF. ^{*} $p < 0,05$ по сравнению с НИСАГ *in vitro*. ^{**} $p < 0,01$ по сравнению с НИСАГ SPF. ^{##} $p < 0,01$ по сравнению с НИСАГ SPF и НИСАГ *in vitro*. НИСАГ – линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. SPF (specified pathogen free) означает отсутствие видоспецифичных патогенных микроорганизмов.

($p < 0,01$) и урикации ($p < 0,01$). Таким образом, по этим трем важным показателям теста ПКЛ крысы НИСАГ обеих групп, рожденные в условиях SPF-вивария, отличались от конвенциональных животных в сходном направлении.

Однако по такому ключевому для данного теста показателю, как время, проведенное в открытых рукавах лабиринта, крысы из группы, полученной посредством ВРТ (НИСАГ *in vitro*), отличались от крыс НИСАГ SPF-статуса. Крысы именно этой группы проводили в открытых рукавах более чем в два раза больше времени ($p < 0,05$) по сравнению с крысами, рожденными естественным путем в SPF-виварии (табл. 2).

Обсуждение

В данном исследовании были обнаружены различия некоторых форм поведения при сравнении крыс НИСАГ SPF-статуса и животных этой же линии конвенционального статуса, в частности это касалось различий в длительности груминга, а также показателей дефекации и урикации. Результаты исследования поведения крыс НИСАГ в тесте ПКЛ показывают, что у конвенциональных животных процент времени груминга был повышен, при этом число актов груминга оставалось примерно одинаковым, что позволяет предположить, что крысы из конвенционального вивария гораздо чаще демонстрируют так называемый «длительный» груминг (т. е. умывание не только головы и лап, но и всего туловища). «Длительный» груминг в отличие от «кратковременного» не является стрессорным поведением для грызунов, а служит именно для очистки тела (Калуев, 2006). Повышение процента времени именно «длительного» груминга у крыс конвенционального вивария вполне объясняется наличием у них патогенной микрофлоры.

Повышение числа актов дефекации и урикации у конвенциональных животных позволяет говорить о более высокой эмоциональности данной группы. Уровень дефекации напрямую отображает соотношение процессов возбуждения и торможения в вегетативной нервной

системе (Маркель, 1981). Ранее в исследовании на мышах было показано, что наличие патогенов само по себе может влиять на некоторые виды поведения, характеризующие состояние тревожности (Lyte et al., 2006). Можно предположить, что присутствие патогенного окружения делает конвенциональных животных более эмоциональными, что отражается в более высоких показателях дефекации и урикации в этой экспериментальной группе. С другой стороны, известно, что структура эпителия кишечника отличается у крыс, выращенных в условиях конвенционального вивария и полностью свободных от всех патогенов (germ-free) (Abrams et al., 1963). Кроме того, было показано, что животные SPF-статуса также имеют различия в структуре кишечника, а именно: меньшую длину ворсин и менее глубокие крипты по сравнению с конвенциональными (Clarke, 1975). Таким образом, придание SPF-статуса может изменять функциональные характеристики кишечного тракта (Sharma et al., 1995), и именно это обстоятельство может быть причиной уменьшения показателей дефекации у животных двух групп НИСАГ, рожденных в условиях SPF-вивария, по сравнению с конвенциональными животными.

Масса тела крыс из SPF-вивария была достоверно повышена по сравнению с конвенциональными – это связано, скорее всего, с различиями в диете. Более того, известно, что SPF-животные набирают вес быстрее, чем конвенциональные (Clarke, 1975). Артериальное давление животных этих двух групп не отличалось, хотя имела место небольшая тенденция к уменьшению показателей АД у животных SPF-статуса. Можно было бы предположить, что животные из конвенционального вивария испытывают больший стресс в условиях наличия патогенной микрофлоры, чем животные SPF-вивария, и это может влиять на выраженность гипертензии у стресс-сенситивной линии гипертензивных крыс НИСАГ. Действительно, в исследованиях на мышах было показано, что наличие патогенной микрофлоры меняет некоторые виды стресс-реактивности (Gareau et al., 2011). Тем не менее достоверных различий по показателям артериального давления

мы не обнаружили ни в одной из исследованных групп. Артериальное давление у крыс линии НИСАГ является генетически обусловленной, полигенной характеристикой, которая при высокой генетической предрасположенности развивается практически при любых внешних условиях (Амстиславский, 2006).

Животные из группы НИСАГ *in vitro* в тесте ПКЛ демонстрировали более низкий уровень тревожности (больше времени проводили в открытых рукавах) в сравнении с группой из SPF-вивария; по другим параметрам животные этой группы не отличались от крыс SPF-статуса, рожденных естественным путем. Феномен снижения тревожности у животных после культивирования и трансплантации уже наблюдался в экспериментах на мышах (Ecker et al., 2004). Отметим, что такой же эффект в тесте ПКЛ был замечен у крыс с повреждением структуры гиппокампа (Kjelstrup et al., 2002), что позволяет предположить, что процедура культивирования каким-то образом нарушает нормальное функционирование гиппокампа.

В данной работе не обнаружены изменения величины артериального давления в зависимости от патогенного фона и применения ВРТ, но выявлены изменения в поведении на крысах линии НИСАГ с гипертонией при разных условиях содержания (конвенциональные и SPF). Впервые было исследовано поведение потомков крыс линии НИСАГ после процедур ВРТ (культивирования и трансплантации) и показано снижение тревожности по результатам тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1.

Работа выполнена на базе вивариев ИЦиГ СО РАН при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ № 13-04-00685.

Авторы выражают благодарность заведующему ЦКП «Виварий конвенциональных животных» к.в.н. В.А. Напримерову.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Амстиславский С.Я. Эмбриотехнологические подходы к сохранению исчезающих видов млекопитающих: Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2006.
Амстиславский С.Я., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Роговая А.А., Рагаева Д.С., Напримеров В.А., Литвинова Е.А., Плюснина И.Ф., Маркель А.Л. Редеривация путем трансплан-

тации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(1):147-161.

Калуев А.В. Анализ грумминга в нейробиологических исследованиях: нейрогенетика, нейрофармакология и экспериментальные модели стресса. Нейронауки. 2006;4(6):14-19.

Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте открытого поля. Журн. высш. нервн. деятельности. 1981;31(2):301-307.

Рагаева Д.С., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Вспомогательные репродуктивные технологии и артериальная гипертензия. Онтогенез. 2014;45(5):299-313.

Abrams G.D., Bauer H., Sprinz H. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. Lab Invest. 1963;12:355-364.

Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Igonina T., Abramova T., Rozhkova I. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*). Theriogenology. 2015;82:1056-1063. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.013

Clarke R.M. Diet, mucosal architecture and epithelial cell production in the small intestine of specified-pathogen-free and conventional rats. Laboratory Animals. 1975;9:201-209. DOI: 10.1258/002367775780994600

Ecker D.J., Stein P., Xu Z., Williams C.J., Kopf G.S., Bilker W.B., Abel T., Schultz R.M. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004;101(6):1595-1600. DOI: 10.1073/pnas.0306846101

Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramanel J., Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum. Reprod. 2000;4:905-910. DOI: 10.1093/humrep/15.4.905

Festing M.F.W., Baumans V., Combes R.D., Halder M., Hendriksen C.F., Howard B.R., Wilson M.S. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. ATLA-NOTTINGHAM. 1998;26:283-302.

Gareau M.G., Wine E., Rodrigues D.M., Cho J.H., Whary M.T., Philpott D.J., Macqueen G., Sherman P.M. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. Gut. 2011;60(3):307-317. DOI: 10.1136/gut.2009.202515

Kjelstrup K.G., Tuvnes F.A., Steffenach H.A., Murison R., Moser E.I., Moser M.B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002;99:10825-10830. DOI: 10.1073/pnas.152112399

Lyte M., Li W., Opitz N., Gaykema R.P., Goehler L.E. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. Physiol. Behav. 2006;89(3):350-357. DOI: 10.1016/j.physbeh.2006.06.019

Rodgers R.J., Cole J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. Ethol. Psychopharmacol. 1994.

Sharma R., Schumacher U., Ronaasen V., Coates M. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. Gut. 1995;36(2):209-214.

Tanaka A., Matsuda H. Expression of nerve growth factor in itchy skins of atopic NC/NgaTnd mice. J. Vet. Med. Sci. 2005;67(9):915-919. DOI: 10.1292/jvms.67.915

Van Soom A., Wrathall A.E., Herrler A., Nauwynck H.J. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? Reprod. Fert. Dev. 2010;22:21-31. DOI: 10.1071/RD09230

Проведение и автоматизация теста «водный лабиринт Морриса» в условиях SPF-вивария

Н.В. Хоцкин¹, В.А. Куликов², Е.Л. Завьялов¹, Д.В. Фурсенко¹, А.В. Куликов^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт автоматики и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

«Водный лабиринт Морриса» является основным тестом для изучения пространственного обучения и памяти у лабораторных грызунов. Он входит в батарею тестов, обязательных для поведенческого фенотипирования мутантных и трансгенных мышей. В то же время проведение данного теста в условиях SPF-вивария весьма затруднено жесткими требованиями контроля патогенов. Другой проблемой при проведении теста является низкая контрастность белого животного на фоне забеленной поверхности воды, что делает невозможным его автоматическую трассировку. В Институте цитологии и генетики СО РАН и Институте автоматики и электрометрии СО РАН на базе EthoStudio была разработана уникальная установка, позволяющая автоматизировать трассировку мышей любого окраса в условиях SPF-вивария. Эта установка включала стенд для пластикового бака (110 × 40 см) для воды, цифровой видеокамеры и системы освещения. Воду для заполнения бака стерилизовали с помощью ультрафиолетового обеззараживателя Van Erp Blue Lagoon UV-C Tech 15 000. Изображение животного покадрово обрабатывалось программой EthoStudio, и вычислялись такие параметры, как латентное время освобождения, пройденный путь, кумулятивное расстояние до платформы и время нахождения в секторах бака. С помощью созданной установки были изучены пространственное обучение и память у мышей линии C57BL/6 и созданной на ее базе линии C57BL/6/Kaiso с нокаутом гена, кодирующего метил-ДНК связывающий белок Kaiso. Было показано, что мыши этих линий способны обучаться находить платформу в водном лабиринте Морриса и помнить положение платформы, по крайней мере, в течение последующих четырех дней.

Ключевые слова: водный лабиринт Морриса; пространственная память; автоматизация измерений; нокаутные мыши.

Conducting and automating the water Morris maze test in SPF conditions

N.V. Khotskin¹, V.A. Kulikov², E.L. Zavyalov¹, D.V. Fursenko¹, A.V. Kulikov^{1,3}

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

² Institute of Automation and Electrometry SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The water Morris maze is the basic test to study the spatial ability to learn as well as spatial memory in laboratory rodents. It is a part of a series of tests necessary for behavioral phenotyping of mutant and transgenic mice. At the same time, conducting this test in SPF conditions must comply with very strict regulations concerning pathogen control. A white animal on the surface of whitened water is low contrast and this does not allow the animal to be traced automatically, which represents yet another major problem. A unique installation based on EthoStudio has been developed at the Institute of Cytology and Genetics SB RAS and the Institute of Automation and Electrometry SB RAS. This installation automates the process of tracing mice of any coat color in SPF conditions. This includes a setup to install a plastic water reservoir (110 × 40 cm), a digital camera and a light source. Water to fill the reservoir was sterilized using a Van Erp Blue Lagoon UV-C Tech 15 000 ultraviolet decontaminator. The image of an animal was processed in a frame-by-frame fashion using the EthoStudio program, with the following parameters calculated: latent release time, route covered, cumulative distance to the platform and the time spent in the reservoir sectors. With this installation, we were able to study the spatial ability to learn and spatial memory in mice of the C57BL/6 strain and in mice of the C57BL/6/Kaiso strain developed on the C57BL/6 background, with the gene encoding the methyl-DNA binding Kaiso protein knocked-out. It has been demonstrated that mice of these strains are able to learn to find the platform in the water Morris maze and have the location of the platform in their memory for at least the next four days.

Key words: water Morris maze; spatial memory; measurement automation; knockout mice.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Хоцкин Н.В., Куликов В.А., Завьялов Е.Л., Фурсенко Д.В., Куликов А.В. Проведение и автоматизация теста «водный лабиринт Морриса» в условиях SPF-вивария. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):388-393. DOI 10.18699/VJ15.049

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Khotskin N.V., Kulikov V.A., Zavyalov E.L., Fursenko D.V., Kulikov A.V. Conducting and automating the water Morris maze test in SPF conditions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):388-393. DOI 10.18699/VJ15.049

DOI 10.18699/VJ15.049

УДК 591.5:57.088

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

Принята к публикации 20.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

✉ e-mail: v_kulikov@bionet.nsc.ru; khotskin@bionet.nsc.ru; shverter@mail.ru

Обучение – сложный процесс формирования нового поведения, и его изучение является очень важным для понимания функционирования нервной системы. Водный лабиринт Морриса (ВЛМ) является одной из основных моделей изучения пространственной памяти и процесса обучения у лабораторных грызунов. ВЛМ входит в батарею тестов, обязательных для поведенческого фенотипирования мутантных и трансгенных мышей (Crawley, 2008). Кроме того, этот тест широко используется для изучения нарушений обучения, памяти и механизма их фармакологической коррекции (D’Hoodge, De Deyn, 2001). ВЛМ широко используется для изучения нейропротекторного действия нейротрофических факторов (Tandon et al., 1999; Vlaha et al., 2000; Cirulli et al., 2000; 2004; Kulikov et al., 2014).

ВЛМ представляет собой цилиндрический бассейн, заполненный подкрашенной водой и виртуально разделенный на четыре сектора. В середину одного из секторов (первый, или целевой, сектор) помещают платформу, верхняя поверхность которой находится под водой на глубине 0,5 см и не видна животному. Тест включает два протокола: обучение и проверку. В процессе обучения мышь в течение нескольких последовательных дней обучают находить платформу и выбираться из воды, используя ближние ориентиры, дальние ориентиры или запоминая последовательность движений (D’Hoodge, De Deyn, 2001). Успешность обучения оценивают по уменьшению таких параметров, как латентное время спасения на платформе, расстояние, пройденное от места помещения в воду до платформы, и кумулятивная дистанция между центром мыши и платформой (Gallagher et al., 1993; Dalm et al., 2000, 2009). Если животное запомнило положение платформы, то во время проверки, когда платформу убирают, она большее время будет находиться в целевом секторе (D’Hoodge, De Deyn, 2001).

В последнее время широкое распространение получила автоматическая трассировка перемещения животного с помощью присоединенной к компьютеру цифровой видеокамеры, которая является более точным и объективным методом изучения поведения, чем визуальная регистрация (Noldus et al., 2001; Spink et al., 2001).

Автоматическая трассировка движения животного в ВЛМ сопряжена с рядом технических трудностей. Первая трудность обусловлена низким контрастом животного на фоне забеленной поверхности воды. Регистрация в проходящем свете является одним из решений этой проблемы (Куликов и др., 2007; Kulikov et al., 2008). Однако большие вес и площадь бака с водой затрудняют использование проходящего освещения. Наконец, в условиях SPF-вивария вода не должна содержать бактерии, а использование специальных антибактериальных фильтров значительно повышает стоимость эксперимента.

Поведенческое фенотипирование мутантных и трансгенных мышей является важнейшей задачей исследований по нейрогенетике поведения (Crawley, 2008). Белок Каизо является одним из факторов транскрипции, который узнает метилированные цитозины в молекуле ДНК, связывается с ними и подавляет транскрипцию генов (Yoon et al., 2003). Мыши с нокаутом гена *Kaiso* (C57BL/6/*Kaiso*, KO) отличаются от мышей дикого типа (C57BL/6, WT) повы-

шенной двигательной и исследовательской активностью в тесте «открытое поле» и сниженным временем депрессивно-подобной неподвижности в тесте «принудительное плавание» (Коростина, Куликов, 2015).

Целью данной работы являются разработка установки для проведения теста ВЛМ с регистрацией в проходящем свете, соответствующей требованиям SPF-вивария, и изучение влияния нокаута гена *Kaiso* на обучение и пространственную память мышей.

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 проводили на половозрелых самцах мышей линий C57BL/6 (WT, $n = 9$) и C57BL/6/*Kaiso* (KO, $n = 9$). Линия C57BL/6 была выбрана потому, что она наиболее часто используется при создании большинства мутантных и трансгенных линий мышей, в том числе и при создании линии C57BL/6/*Kaiso*. Линия C57BL/6/*Kaiso* была выведена Е.Б. Прохорчуком (Prokhortchouk et al., 2006) и получена в SPF-виварий ИЦиГ СО РАН из питомника лабораторных животных РАН «Пушино» (г. Пушино, Россия). Все животные были в возрасте 11 недель и весили 26 ± 1 г. С момента отсадки от матерей мышей содержали в группах по 6 особей в индивидуально вентилируемых пластиковых клетках (Techniplast, Италия) при регулируемом 14-часовом освещении, температуре 23°C и влажности 60%. Полноценный корм и воду они получали без ограничения. За два дня до эксперимента животных рассаживали в отдельные вентилируемые клетки того же размера для снятия группового эффекта. Все эксперименты проводили во время сумерек и начала ночной фазы (15:00–18:00). 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.

Установка

Для тестирования поведения использовался программно-аппаратный комплекс EthoStudio, созданный в ФГБНУ «Институт автоматики и электрометрии СО РАН» и адаптированный для SPF-вивария. Экспериментальная установка состояла из металлического стенда ($120 \times 120 \times 220$ см), на котором крепилась полка (120×120 см) из прозрачного оргстекла толщиной 10 мм с круглым бассейном (110×30 см) из матового полихлорвинила. Бассейн освещали через матовое дно двумя галогеновыми лампами 35 Вт каждая, расположенными на расстоянии 50 см под дном бассейна (рис. 1). В бассейн наливали воду (температура 25°C), которая проходила предварительную стерилизацию при помощи ультрафиолетового обеззараживателя Van Erp Blue Lagoon UV-C Tech 15 000, до отметки 15 см и подкрашивали ее в белый цвет при помощи автоклавированного сухого молока. Поверхность



Рис. 1. Общий вид ВЛМ для трассировки животных в проходящем свете.
1 – видеокамера; 2 – ближний ориентир; 3 – ультрафиолетовый очиститель; 4 – бассейн;
5 – компьютер; 6 – лампа.

бассейна была виртуально разделена на четыре сектора. В геометрический центр нижнего правого сектора (первый, или целевой, сектор) помещали стеклянную платформу диаметром 6 см, верхняя поверхность которой была скрыта на 0,5 см под водой и невидима для мыши. На ближайшую к платформе стенку бассейна (напротив платформы) наклеивался темный квадрат 6×12 см, который служил внешним ориентиром.

Протокол тестирования

Тест состоял из двух частей: обучения и проверки. В течение последовательных 4 дней мышь обучали находить платформу. Ежедневное обучение включало 3 попытки с интервалом 30 с. В ходе этих попыток животное последовательно помещали в различные секторы: второй, третий и четвертый (по часовой стрелке от целевого). Движения животного в течение минуты регистрировали цифровой видеокамерой, расположенной на высоте 220 см от пола и присоединенной к компьютеру через USB-интерфейс. Свет, проходя через толщу воды в бассейне, попадал в объектив цифровой видеокамеры. Мышь любого окраса выглядела, как темный силуэт на ярком фоне. Если мышь не находила платформу, ее принудительно помещали на нее. В любом случае животное оставалось на платформе не менее 15 с.

Трассировку проводили в режиме реального времени с одновременной записью в компрессированный видеофайл с помощью программы EthoStudio (Куликов и др., 2007; Kulikov et al., 2008), которая последовательно анализировала кадры изображения, находила ассоциированные с мышью пиксели и вычисляла следующие показатели: 1) латентное время освобождения (с), в течение которого мышь находила платформу и забиралась на нее; 2) путь (см), который животное проходило от места помещения в воду до платформы; 3) кумулятивную дистанцию между центром мыши и платформой (см), которую вычисляли как сумму всех расстояний между геометрическим центром мыши и центром платформы. Если животное не находило платформу, то значение латентного времени принимали равным 60 с. Для каждого дня вычисляли средние значения латентного времени, пройденного пути и кумулятивной дистанции по 3 попыткам. Эффективность обучения оценивали по уменьшению значений этих трех показателей.

На 5-й день проводили проверку пространственной памяти. Для этого платформу убирали и животное три раза с интервалом 30 с помещали в центр бассейна и в течение минуты трассировали его движения. С помощью карты распределения ассоциированных с животным пикселей определяли время нахождения в каждом из секторов (%) и вычисляли средние значения для 3 попыток. Статистически значимое превышение времени нахождения в целевом секторе над случайным (25 %) свидетельствовало о том, что мышь помнит расположение платформы. Для оценки длительности удержания следов памяти проверку повторяли через 4 дня.

Статистика

Значения показателей для каждого животного представляли как среднее \pm ошибка средней. Значения латентного времени, пройденного пути и кумулятивной дистанции в различные дни обучения анализировали двухфакторным ANOVA для зависимых наблюдений (дни) с последующим *post hoc* сравнением по Фишеру. Значения времени в целевом секторе при проверке сравнивали со случайным (25 %) с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Мыши обеих линий демонстрировали похожую хорошую обучаемость в ВЛМ. Уже на 3-й день обучения 8 из 9 протестированных животных каждой линии достоверно снижали латентное время, пройденный путь и кумулятивную дистанцию до платформы по сравнению с 1-м днем (таблица, рис. 2). Эти сниженные значения сохранялись и на 4-й день обучения (рис. 2). В то же время по одной мыши от каждой линии ни разу не смогли найти платформу.

В ходе проверки запоминания положения платформы на 5-й день 8 из 9 мышей каждой линии, которых обучили находить платформу, помнили ее местоположение: время их нахождения в целевом секторе достоверно отличалось от случайного (25 %) (рис. 3, 4). Более того, они демонстрировали предпочтение целевого сектора через 4 дня после проверки (рис. 4).

Эффекты факторов «генотип», «время обучения» и их взаимодействия при сравнении динамики обучения мышей WT и КО в ВЛМ с помощью двухфакторного ANOVA

Показатель	Генотип	Дни обучения	Взаимодействие
Латентное время	$F_{1,16} < 1$	$F_{3,48} = 13,57, p = 0,000002$	$F_{3,48} < 1$
Пройденный путь	$F_{1,16} < 1$	$F_{3,48} = 17,1, p < 0,000001$	$F_{3,48} < 1$
Кумулятивная дистанция	$F_{1,16} < 1$	$F_{3,48} = 12,93, p = 0,000003$	$F_{3,48} < 1$

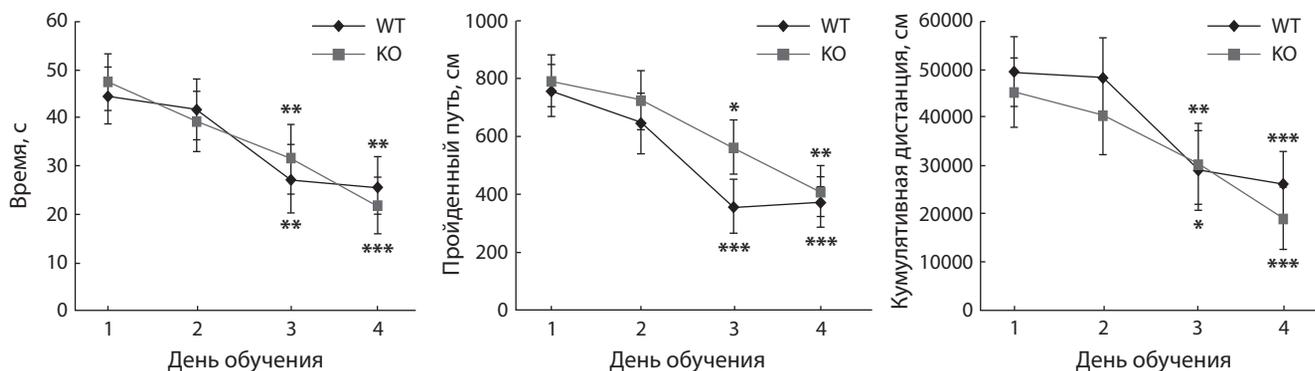


Рис. 2. Динамика изменения латентного времени, пройденного пути и кумулятивной дистанции до платформы в процессе обучения мышей WT и КО в ВЛМ.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с первым днем.

При проверке у мышей WT была выявлена достоверная негативная корреляция ($r = -0,79, p < 0,05$) между латентным временем на 4-й день обучения и временем в целевом секторе на 5-й день, тогда как у мышей КО такой корреляции выявлено не было ($r = -0,3, p > 0,05$).

Обсуждение

Была создана уникальная установка для автоматической трассировки мышей в тесте ВЛМ с обращенным освещением. Конструкция установки позволяет выдерживать вес бассейна с водой (250 кг). УФ-обеззараживатель воды Van Eep Blue Lagoon UV-C Tech 15 000 позволяет быстро и дешево получить большую массу лишенной микробов воды. Измерение в проходящем свете значительно увеличивает контрастность изображения и обеспечивает эффективную автоматическую трассировку животного.

В наших предыдущих исследованиях мы не использовали внешние ориентиры. Мышей помещали в воду в фиксированной точке, и они находили платформу, ориентируясь только на сформированную в своем мозгу пространственную карту ВЛМ

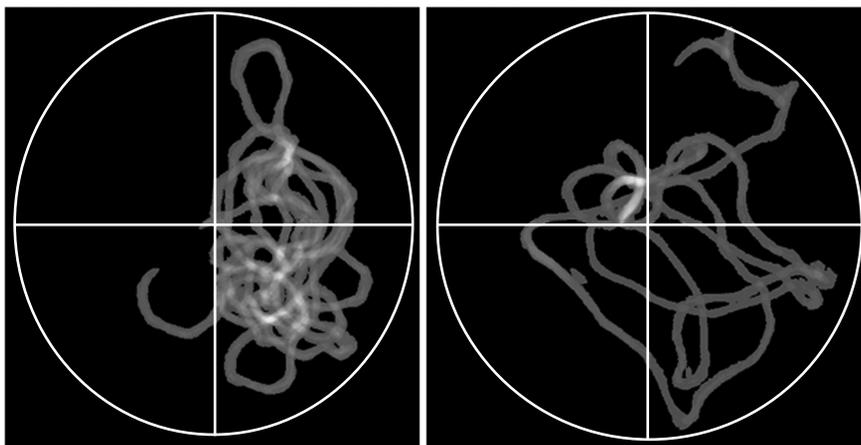


Рис. 3. Траектория движения и плотность нахождения мыши (WT) в секторах ВЛМ во время проверки на 5-й день после обучения.

Слева – траектория движения животного, которое успешно обучилось в течение четырех дней и помнит место платформы. Справа – траектория животного, которое не помнит место платформы и случайно исследует все сектора. В процессе обучения платформа располагалась в правом нижнем (целевом) секторе.

(Хоцкий и др., 2014; Kulikov et al., 2014; Naumenko et al., 2014). Было отмечено, что при таком протоколе теста мыши обучаются медленно и для исследованных линий четырех дней было явно мало для запоминания положения платформы. Кроме того, поскольку мышей помещали в воду всегда на границе II и III секторов, при проверке возникала значительная ошибка, связанная с распределением времени нахождения животного в секторах (Kulikov et al., 2014). Это создавало затруднения при использовании классического критерия

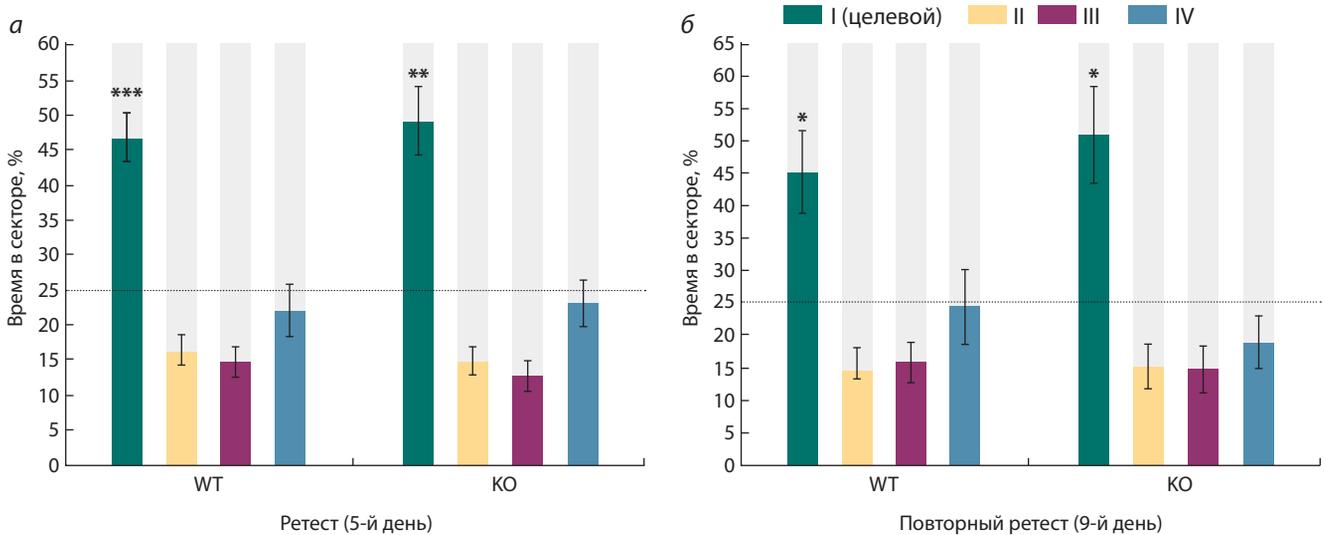


Рис. 4. Время в секторах ВЛМ у мышей WT и KO во время первой проверки на 5-й день (а) и второй проверки на 9-й день после обучения (б). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению со случайным нахождением в секторе (25 %).

запоминания – времени в целевом секторе. Создавалось впечатление, что мыши многих линий не помнят место платформы.

В данном исследовании мы разработали другую стратегию, которая включала внешний ориентир (темный прямоугольник, наклеенный на стенку бассейна напротив платформы). Во время обучения мышей помещали в воду в разных точках бассейна. В то же время при проверке мышей помещали в центр бассейна, что позволяло избежать влияния начальной точки на предпочтение животными конкретного сектора.

Такая измененная стратегия обучения (1) позволила улучшить ее динамику – около 90 % мышей линии C57BL/6 уверенно находили платформу уже на 3-й день обучения – и (2) показала, что мыши линии C57BL/6 хорошо помнят место платформы на 5-й и 9-й дни после обучения и ищут ее в соответствующем секторе. Это, по-видимому, произошло потому, что мыши в процессе обучения смогли связать внешний ориентир с положением платформы. У мышей C57BL/6 наблюдалась хорошая корреляция динамики обучения с памятью: мыши, которые быстрее находили платформу в процессе обучения (меньшее латентное время), больше времени проводили в целевом секторе во время проверки на 5-й день.

Разработанная установка, программное обеспечение и протокол теста были использованы для выяснения влияния нокаута гена *Kaiso* на способности мышей к обучению и запоминанию в ВЛМ. В статье, опубликованной в этом номере (Коростина, Куликов, 2015), показано, что мыши с нокаутом гена *Kaiso* (KO) более подвижны в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» по сравнению с животными WT. В данном эксперименте мы не нашли каких-либо достоверных отличий между мышами KO и WT по динамике обучения и по способности к запоминанию места платформы в ВЛМ. Способности к обучению и памяти обычно связывают с нейронами коры и гиппокампа (Derdikman, Moser, 2010; Moser, Moser,

2014; Moser et al., 2015). Поэтому отсутствие эффекта нокаута гена *Kaiso* на обучение и память мышей KO позволяет предположить, что данный нокаут не затрагивает нейроны гиппокампа.

Таким образом, разработанная установка позволяет изучать механизмы обучения и пространственной памяти в ВЛМ в условиях SPF-вивария с последующим возвращением животных в комнату содержания без опасности заражения как экспериментальных, так и содержащихся там других животных. Разработанное программное обеспечение полностью автоматизирует вычисление всех необходимых параметров, что соответствует требованиям высокой точности и объективности измерения. Предложенный протокол обучения и проверки исключает влияние начального положения животного на результаты обучения и память. Установка, программное обеспечение и протокол теста используются для поведенческого фенотипирования мутантных и трансгенных животных в условиях SPF-вивария.

Благодарности

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта VI53.2.2 и поддержана проектом РНФ № 14-25-00038.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Коростина В.С., Куликов А.В. Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом гена *Kaiso*. Вавилонский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):399-403. DOI: 10.18699/VJ15.051
- Куликов В.А., Киричук В.С., Тихонова М.А., Куликов А.В. Использование плотности вероятности для автоматизации измерения пространственного предпочтения в этологическом эксперименте. Докл. АН. 2007;417:279-283.
- Хоцкин Н.В., Фурсенко Д.В., Базовкина Д.В., Куликов В.А., Куликов А.В. Автоматическое измерение характеристик пространственного обучения у мышей в тесте Водный Лабиринт Морриса

- с обращенным освещением. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2014;100:36-44.
- Blaha G.R., Raghupathi R., Saatman K.E., McIntosh T.K. Brain-derived neurotrophic factor administration after traumatic brain injury in the rat does not protect against behavioral or histological deficits. *Neuroscience*. 2000;99:483-493.
- Cirulli F., Berry A., Alleva E. Intracerebroventricular administration of brain-derived neurotrophic factor in adult rats affects analgesia and spontaneous behavior but not memory retention in a Morris water maze task. *Neurosci. Lett*. 2000;287:207-210.
- Cirulli F., Berry A., Chairotti F., Alleva E. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus*. 2004;14:802-807.
- Crawley J.N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron*. 2008;57:809-818.
- D'Hoodge R., De Deyn P.P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res*. 2001;36:60-90.
- Dalm S., Grootendorst J., de Kloet E.R., Oitzl M.S. Quantification of swim patterns in the Morris water maze. *Behav. Res. Meth. Instrum. Comput.* 2000;32:134-139.
- Dalm S., Schwabe L., Schachinger H., Oitzl M.S. Post-training self administration of sugar facilitates cognitive performance of male C57BL/6J mice in two spatial learning tasks. *Behav. Brain Res*. 2009;198:98-104.
- Derdikman D., Moser E.I. A manifold of spatial maps in the brain. D.Derdikman, E.I.Moser. *Trends Cogn. Sci*. 2010;14:561-569.
- Gallagher M., Burwell R., Burchinal M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav. Neurosci*. 1993;107:618-626.
- Kulikov A.V., Fursenko D.V., Khotskin N.V., Bazovkina D.V., Kulikov V.A., Naumenko V.S., Bazhenova E.Y., Popova N.K. Spatial learning in the Morris water maze in mice genetically different in the predisposition to catalepsy: the effect of intraventricular treatment with brain-derived neurotrophic factor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014;122:266-272.
- Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. *J. Neurosci. Meth.* 2008;170:345-351.
- Moser E., Moser M.B. Mapping your every move. *Cerebrum*. 2014; 2014:4.
- Moser M.B., Rowland D.C., Moser E.I. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015;7(2).
- Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Ilchibaeva T.V., Khotskin N.V., Semenova A.A., Popova N.K. Effect of GDNF on depressive-like behavior, spatial learning and key genes of the brain dopamine system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains. *Behav. Brain Res*. 2014;274:1-9.
- Noldus L.P.J.J., Spink A.J., Tegelenbosch R.A.J. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Meth. Instr. Compt.* 2001;33:398-414.
- Spink A.J., Tegelenbosch R.A.J., Buma M.O.S., Noldus L.P.J.J. The EthoVision video tracking system – a tool for behavioral phenotyping of transgenic mice. *Physiol. Behav.* 2001;73:731-744.
- Tandon P., Yang Y., Das K., Holmes G.L., Stafstrom C.E. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in seizures during development. *Neuroscience*. 1999;91(1):293-303.
- Yoon H.G., Chan D.W., Reynolds A.B., Qin J., Wong J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol. Cell*. 2003;12(3):723-734.

Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли

Д.В. Фурсенко¹, Н.В. Хоцкин¹, В.А. Куликов², А.В. Куликов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт автоматики и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Фактор некроза опухоли (ФНО) – это цитокин, обладающий как патологической, так и гомеостатической функцией в центральной нервной системе (ЦНС). Показано участие ФНО в механизме таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и рассеянный склероз. Тем не менее роль ФНО в ЦНС в нормальных физиологических условиях изучена слабо. В Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН группой С.А. Недоспасова была создана линия мышей с нокаутом по ФНО (TNFKO) на основе генома линии C57Bl/6 (WT). В нашей работе мы сравнивали поведение половозрелых самцов TNFKO и WT в стандартной батарее тестов, включающей «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание». Мы показали, что дефицит ФНО не влияет на двигательную активность и исследовательское поведение мышей в тесте «открытое поле». Тем не менее в этом тесте мыши TNFKO больше времени проводили в центре арены по сравнению с мышами WT, но при этом имели выше уровень дефекаций и ниже длительность стоек. Этот результат свидетельствует о том, что легкий стресс в тесте «открытое поле» скорее дезориентирует мышей TNFKO, чем вызывает у них тревогу. Не было обнаружено различий по выраженности тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» и депрессивно-подобного поведения в тесте «принудительное плавание» между мышами этих линий. Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие данного цитокина влечет за собой изменения в нейрофункциональных взаимодействиях, что приводит к изменению у мышей ответа на легкий стресс в тесте «открытое поле».

Ключевые слова: фактор некроза опухоли; нокаутные мыши; открытое поле; приподнятый крестообразный лабиринт; принудительное плавание.

Behavioral phenotyping of mice deficient for tumor necrosis factor

D.V. Fursenko¹, N.V. Khotskin¹, V.A. Kulikov², A.V. Kulikov¹

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

² Institute of Automation and Electrometry SB RAS, Novosibirsk, Russia

The tumor necrosis factor (TNF) is a cytokine exerting both homeostatic and pathophysiological roles in the central nervous system (CNS). It has been demonstrated that TNF plays roles in such diseases as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis. Nevertheless, the role of TNF in the CNS under normal physiological conditions is poorly studied. A novel mouse strain with TNF deficiency (TNFKO) was developed in S.A. Nedospasov's laboratory of Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences on the C57Bl/6 (WT) background. In our study, we compared the behavior of TNFKO and WT adult mice in a battery of tests: open-field, elevated plus-maze and the forced-swim test. We showed that TNF deficiency had no effect on locomotor activity or exploration in the open-field test. At the same time, in this test, TNFKO mice spent more time in the center of the arena, but had a higher level of defecation and lower rearing duration. This result indicates that, in the open-field conditions, TNFKO mice show disorientation rather than anxiety-like behavior. There were no differences between TNFKO and WT in anxiety level in the elevated plus-maze test or in depressive-like behavior in the forced-swim test. These data suggest that TNF deficiency leads to changes in neurofunctional interactions that alter the mouse response to mild stress in the open-field test.

Key words: tumor necrosis factor; knockout mice; open-field; elevated plus-maze; forced-swim test.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Фурсенко Д.В., Хоцкин Н.В., Куликов В.А., Куликов А.В. Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):394-398. DOI 10.18699/VJ15.050

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Fursenko D.V., Khotskin N.V., Kulikov V.A., Kulikov A.V. Behavioral phenotyping of mice deficient for tumor necrosis factor. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):394-398. DOI 10.18699/VJ15.050

DOI 10.18699/VJ15.050

УДК 577.21:57.02

Поступила в редакцию 07.06.2015 г.

Принята к публикации 04.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

Фактор некроза опухоли (ФНО) – это белок, относящийся к группе провоспалительных цитокинов, выполняющий различные функции в организме (Bradley, 2008; Kaster et al., 2012; Montgomery, Bowers, 2012). ФНО на периферии организма синтезируется преимущественно активированными макрофагами и Т-лимфоцитами (Bradley, 2008), в центральной нервной системе – резидентными иммунными клетками, микроглией, астроцитами, а также клетками некоторых нейрональных популяций (Li et al., 2008; McCoy, Tansey, 2008). ФНО участвует в защите организма от бактериальных, вирусных и паразитических инфекций (Bradley, 2008), а также вместе с интерлейкином-1 и интерлейкином-6 обуславливает синдром больного при воспалительных процессах (Dantzer, 2001). Помимо участия в ответе на патогены, ФНО играет роль в развитии и формировании центральной нервной системы, в синаптической передаче, нейрогенезе во взрослом организме (Montgomery, Bowers, 2012). Кроме того, ФНО представляет интерес в качестве мишени для фармакологического воздействия при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и рассеянный склероз (Montgomery, Bowers, 2012).

Нокаут животных по какому-либо гену является удобной моделью для изучения роли продукта этого гена в жизнедеятельности организма. В настоящее время существует несколько линий мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли (Pasparakis et al., 1996; Körner et al., 1997; Marino et al., 1997). Одна из таких линий была создана группой С.А. Недоспасова специфическим удалением 3-го и 4-го экзонов. Было показано, что у мышей данной линии полностью отсутствуют Пейеровы бляшки, в то время как у мышей других линий с дефицитом по ФНО Пейеровы бляшки присутствуют, хотя их количество сокращено (Kuprash et al., 2005). Несмотря на то что данная линия активно используется для изучения роли ФНО на периферии (Drutskaya et al., 2005; Schioppa et al., 2011), центральное действие ФНО в свободных от патогенов условиях у таких мышей не изучалось. И хотя существуют работы, в которых изучалось поведение мышей с нокаутом по ФНО (Yamada et al., 2000; Golan et al., 2004; Samaga et al., 2013), поведенческое фенотипирование данной линии является необходимым этапом для дальнейших исследований этих животных.

Целью данной работы было изучение двигательной активности, тревожности и депрессивно-подобного поведения у мышей с нокаутом по ФНО. Для этого проводили сравнения в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание» мышей дикого типа, C57BL/6 (WT), и с нокаутом гена ФНО (TNFKO).

Материалы и методы

Животные

Исследования проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на половозрелых самцах мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли (TNFKO) (Kuprash et al., 2005) ($n = 12$)

и мышцах линии C57BL/6 (WT) ($n = 12$), на основе которой был получен данный нокаут. Все животные были в возрасте от 3 до 4 мес. и имели массу 27 ± 2 г. С момента отсадки от матерей мыши содержались в группах по 6 особей в индивидуально вентилируемых клетках (Techniplast, Италия) при регулируемом световом цикле (14:10, рассвет в 1:00, закат в 15:00), температуре 22°C и влажности воздуха 60 %. Животным был предоставлен свободный доступ к корму и воде. За два дня до эксперимента животных рассаживали в отдельные клетки того же размера для снятия группового эффекта. Все процедуры тестирования начинались в 15:30. Содержание и тестирование животных проводили в соответствии с Инструкцией по содержанию и использованию лабораторных животных (NIH Publication N 80–23, США) и были одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

Тестирование поведения

Для тестирования поведения использовали программно-аппаратный комплекс EthoStudio, разработанный в ФГБУН «Институт автоматизации и электрометрии СО РАН». Данный комплекс включал в себя стенд для установки арен, освещение и цифровой 3D сенсор Kinect (Microsoft), присоединенный к компьютеру через USB-интерфейс. Этот сенсор позволяет одновременно получать обычные 2D и 3D изображения животного (Kulikov et al., 2014). В тестах «открытое поле» и «принудительное плавание» источник света помещался под ареной (обращенное освещение), что улучшало контраст животного с фоном (Kulikov et al., 2008). В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» арена освещалась сверху рассеянным светом, что позволяло автоматически трассировать животное черной масти в открытых рукавах и центре лабиринта. Данные с сенсора передавались на компьютер, где обрабатывались программой EthoStudio, которая вычисляла путь, пройденный животным, и время, проведенное в той или иной части арены (в % от общего времени тестирования). Некоторые параметры фиксировались наблюдателем вручную с помощью нажатий на клавиши (Kulikov et al., 2008).

Тест «открытое поле». Установка для тестирования представляла собой круглую арену диаметром 60 см со стенками высотой 30 см. Животное помещали у стенки арены и давали свободно исследовать пространство в течение 5 мин. Автоматически оценивали общий пройденный путь (см) и время (%) нахождения животного в центральной части арены (30 см в диаметре). Вручную считали количество и среднюю продолжительность вертикальных стоек (с), число дефекаций (Kulikov et al., 2008). После каждого животного арену очищали влажной и сухой салфетками.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Установка для данного теста представляла собой два пересекающихся по центру под прямым углом рукава длиной 30 см и шириной 6 см, находящихся на высоте 60 см над уровнем земли. Одна пара рукавов имела стенки высотой 20 см (закрытые рукава, безопасные), а другая пара была без стенок (открытые рукава, потенциально опасные). Животное сажали в место пересечения двух

Поведение мышей линий WT и TNFKO в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание»

Тест	WT	TNFKO	F	p
«открытое поле»				
пройденный путь, м	13,28 ± 0,84	11,92 ± 0,83	$F_{1,22} < 1$	
время в центре, %	15,7 ± 1,48	30,27 ± 3,14	$F_{1,22} = 17,56$	$p < 0,001$
кол-во вертикальных стоек	40,16 ± 7,03	32,75 ± 5,13	$F_{1,22} < 1$	
средняя продолжительность вертикальной стойки, с	0,64 ± 0,04	0,5 ± 0,04	$F_{1,22} = 7,28$	$p < 0,05$
кол-во дефекаций	0,16 ± 0,11	2,33 ± 0,48	$F_{1,22} = 19,16$	$p < 0,001$
«приподнятый крестообразный лабиринт»				
время в рукавах, %				
открытых	11,53 ± 1,59	13,67 ± 3,9	$F_{1,22} < 1$	
закрытых	70,46 ± 2,81	69,55 ± 6,22	$F_{1,22} < 1$	
«принудительное плавание»				
время неподвижности, с	151,56 ± 7,69	154,42 ± 6,42	$F_{1,19} < 1$	

рукавов и автоматически фиксировали перемещение в течение 5 мин. Автоматически оценивали время (%), проведенное в центре, в открытых и закрытых рукавах (Kulikov et al., 2014).

Тест «принудительное плавание». Цилиндр высотой 30 см и диаметром 15 см наполовину заполняли водой ($t = 25^\circ\text{C}$). В воду помещали мышь и в течение 6 мин фиксировали изменение контура животного. Оценивали суммарное время неподвижности животного за последние 4 мин (Kulikov et al., 2010).

Статистика

Результаты представляли как средние ± ошибка среднего и сравнивали с помощью однофакторного ANOVA.

Результаты

В тесте «открытое поле» не было найдено достоверных различий по величине пройденного пути ($F_{1,22} < 1$) и числу вертикальных стоек ($F_{1,22} < 1$) между мышами KO и WT. В то же время мыши KO проводили достоверно больше времени в центре арены по сравнению с мышами WT ($F_{1,22} = 17,56, p < 0,001$), имели меньшую среднюю продолжительность вертикальной стойки ($F_{1,22} = 7,28, p < 0,05$) и увеличенное количество дефекаций ($F_{1,22} = 19,16, p < 0,001$) (таблица).

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» мыши линий KO и WT не имели достоверных различий по времени, проведенному в открытых ($F_{1,22} < 1$), закрытых рукавах ($F_{1,22} < 1$) и в центре ($F_{1,22} < 1$) (таблица).

В тесте «принудительное плавание» не было обнаружено различий по времени неподвижности между мышами линий KO и WT ($F_{1,19} < 1$) (таблица).

Обсуждение

В данной работе мы изучали влияние нокаута гена ФНО на двигательную активность, исследовательское поведение, тревожность и депрессивно-подобное поведение у линии мышей, полученных группой С.А. Недоспасова

(Kuprash et al., 2005). Для этого были использованы тесты «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание», которые являются обязательными для поведенческого фенотипирования мутантных и трансгенных мышей (Crawley, 2008).

В тесте «открытое поле» в условиях мягкого стресса (открытое освещенное пространство, новая обстановка) изучали влияние нокаута по ФНО на двигательную активность (пройденный путь), исследовательское поведение (число и длительность вертикальных стоек) и тревожность (время в центре, количество дефекаций) (Denenberg, 1969; Prut, Belzung, 2003; Tecott, 2003; Standford, 2007). Нокаут по ФНО не влияет на двигательную активность мышей, что также было показано на другой нокаутной линии (Camara et al., 2013). Противоречивые результаты были получены относительно влияния нокаутирования по ФНО на исследовательскую активность и тревожность. Открытые освещенные пространства для мышей являются потенциально опасными. Попадая в такие условия, мыши с высоким уровнем тревожности будут больше времени проводить у стенок арены, меньше исследовать арену, а мыши с низким уровнем тревожности будут наоборот больше времени проводить в центре и активной исследовать пространство. По сравнению с мышами дикого типа, мыши нокаутной линии достоверно больше времени проводят в центре арены, что соответствует более низкому уровню тревожности, но при этом средняя продолжительность вертикальных стоек у них меньше, что свидетельствует о сниженном исследовательском поведении. К тому же у TNFKO увеличено количество дефекаций, что указывает на стрессовое состояние животных.

Чтобы проверить результаты по тревожности, мы использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт». В этом тесте мыши избегают появляться в открытых рукавах из-за высокого риска падения и предпочитают находиться в защищенных закрытых рукавах (Pellow et al., 1985; Belzung, Griebel, 2001; Wahlstein et al., 2003; Milner,

Scabbe, 2008). Мы не обнаружили эффекта дефицита ФНО на время, проведенное в открытых, закрытых рукавах и в центре крестообразного лабиринта.

Интерпретируя результаты, полученные в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «открытое поле», мы пришли к выводу, что состояние мышей с дефицитом ФНО не является тревожным, а скорее дезориентированным. К такому же выводу в своей работе приходят Golan с соавт. (Golan et al., 2004), но в отличие от наших результатов они показали, что мыши с нокаутом по ФНО (Pasparakis et al., 1996) предпочитали находиться на периферии в тесте «открытое поле». Вероятно, данное различие связано с тем, что время тестирования в открытом поле у них составляло 2 мин. Но в других работах исследователи показывают, что нокаут по ФНО влияет на тревожность, правда, результаты получаются противоречивые. Так, Самага с соавт. (Samaga et al., 2013) обнаружили, что нокаутные мыши больше времени проводили в открытых рукавах О-образного лабиринта, что говорит о сниженном уровне тревожности, в то время как в работе Yamada с соавт. (Yamada et al., 2000) показано, что мыши с дефицитом ФНО проводят меньше времени в открытых рукавах, что соответствует повышенной тревожности.

В тесте «принудительное плавание» время неподвижности положительно коррелирует с депрессивно-подобным поведением. Большинство клинически эффективных антидепрессантов снижают время неподвижности в данном тесте (Porsolt et al., 1977; Willner, 1990; Willner, Mitchell, 2002; Cryan, Mombereau, 2004). Как и в работе Самага с соавт. (2013), мы не обнаружили различий по времени неподвижности между нокаутными животными и диким типом, в то время как в работе, выполненной другой группой ученых (Yamada et al., 2000), мыши с дефицитом ФНО меньше замирали в тесте принудительного плавания.

На результаты поведенческих тестов могли оказать влияние: 1) условия содержания животных (в свободной от патогенов среде или нет); 2) время суток, в которое проводилось тестирование; 3) возраст животных; 4) различия в методиках тестирования.

Существует целый ряд цитокинов, которые могут влиять на поведение животных в тестах. При активации иммунной системы происходит выброс в кровь ряда цитокинов, которые, проходя через гематоэнцефалический барьер или передавая через него сигнал, влияют на клетки центральной нервной системы и на поведение. Чтобы минимизировать влияние цитокинов, мы проводили тестирование в свободных от патогенов условиях. Самага с соавт. (2013) в своей работе кроме того провели анализ крови на наличие цитокинов, чтобы показать, что тестирование проводилось в условиях отсутствия воспалительных процессов. В других работах статус животных не указан.

Известно, что уровень некоторых гормонов меняется в течение суток. Самага с соавт. (2013) тестировали своих животных в светлое время суток, когда у мышей отмечается стадия покоя и сна. Поведение тестирования в неурочное время могло повлиять на поведение животных. К сожалению, в других статьях не указано время проведения тестов.

Кроме того, важным фактором, который влияет на поведение нокаутных животных, является возраст. В своей статье Yamada не указывает возраст мышей, между тем есть данные, что с возрастом поведение животных с нокаутом по ФНО меняется чуть ли не на противоположное (McAfoose et al., 2009).

Таким образом, нокаут по ФНО не влияет на двигательную активность и депрессивно-подобное поведение. Однако у него есть определенное влияние на состояние тревожности животного, что требует более детального исследования в других парадигмах.

В данной работе в стандартной батарее тестов была впервые протестирована линия с нокаутом по ФНО, созданная группой С.А. Недоспасова. Нокаут гена ФНО достоверно увеличивал время, проведенное в центре открытого поля, но не влиял на двигательную активность, тревожность в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» и депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание». Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие данного цитокина влечет за собой изменения в нейрофункциональных взаимодействиях, что приводит к изменению ответа на легкий стресс в тесте «открытое поле» у мышей.

Благодарности

Работа была выполнена в рамках бюджетного проекта VI.53.2.1. при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-08254.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Belzung C., Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. *Behav. Brain Res.* 2001;125:141-149.
- Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 2008; 214(2):149-160. DOI: 10.1002/path.2287
- Camara M.L., Corrigan F., Jaehne E.J., Jawahar M.C., Anscob H., Koerner H., Baune B.T. TNF- α and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(12):3102-3114. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2013.09.010
- Crawley J.N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron.* 2008;57:809-818.
- Cryan J.F., Mombereau C. In search of a depressive mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol. Psychiatry.* 2004;9:326-357.
- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav. Immun.* 2001;15(1):7-24.
- Denenberg V.H. Open-field behavior in the rat: What does it mean? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1969;159:852-859.
- Drutskaya M.S., Ortiz M., Liepinsh D.J., Kuprash D.V., Nedospasov S.A., Keller J.R. Inhibitory effects of tumor necrosis factor on hematopoiesis seen in vitro are translated to increased numbers of both committed and multipotent progenitors in TNF-deficient mice. *Exp. Hematol.* 2005;33(11):1348-1356.
- Golan H., Levav T., Mendelsohn A., Huleihel M. Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. *Cereb. Cortex.* 2004;14(1):97-105.
- Kaster M.P., Gadotti V.M., Calixto J.B., Santos A.R., Rodrigues A.L. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharmacology.* 2012;62(1):419-426. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.018

- Körner H., Cook M., Riminton D.S., Lemckert F.A., Hoek R.M., Ledermann B., Kontgen F., Fazekas de St. Groth B., Sedgwick J.D. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol.* 1997;27(10):2600-2609.
- Kulikov A.V., Morozova M.V., Kulikov V.A., Kirichuk V.S., Popova N.K. Automated analysis of antidepressants' effect on the forced swim test. *J. Neurosci. Meth.* 2010;191:26-31.
- Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of special preference in the open field test with transmitted lighting. *J. Neurosci. Meth.* 2008;170:345-351.
- Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikova E.A., Volcho K.P., Khomenko T.M., Salakhutdinov N.F., Popova N.K. Antidepressant activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153): Comparison with classical antidepressants. *Lett. Drug Design Discov.* 2014;11:169-173.
- Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutska M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., Grivennikov S.I., Nedospasov S.A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* 2005;35(5):1592-1600.
- Li J., Ramenaden E.R., Peng J., Koito H., Volpe J.J., Rosenberg P.A. Tumor necrosis factor alpha mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. *J. Neurosci.* 2008;28(20):5321-5330. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3995-07.2008
- Marino M.W., Dunn A., Grahl D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997;94(15):8093-8098.
- McAfoose J., Koerner H., Baune B.T. The effects of TNF deficiency on age-related cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(4):615-619. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2008.10.006
- McCoy M.K., Tansey M.G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation.* 2008;5(45). DOI: 10.1186/1742-2094-5-45
- Milner L.C., Crabbe J.C. Three murine anxiety models: results from multiple inbred strain comparison. *Genes Brain Behav.* 2008;7:496-505.
- Montgomery S.L., Bowers W.J. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(1):42-59. DOI: 10.1007/s11481-011-9287-2
- Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V., Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* 1996;184(4):1397-1411.
- Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 1985;14:149-167.
- Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266:730-732.
- Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;463:3-33.
- Schioppa T., Moore R., Thompson R.G., Rosser E.C., Kulbe H., Nedospasov S., Mauri C., Coussens L.M., Balkwill F.R. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011;108(26):10662-10667. DOI: 10.1073/pnas.1100994108
- Standford C. The open field test: reinventing the wheel. *J. Psychopharmacol.* 2007;21:134-135.
- Tecott L.H. The genes and brain of mice and men. *Am. J. Psychiatry.* 2003;160:646-656.
- Wahlsten D., Rustay N.R., Metten P., Crabbe J.C. In search of a better mouse test. *Trends Neurosci.* 2003;26:132-136.
- Willner P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol. Ther.* 1990;45:425-455.
- Willner P., Mitchell P.J. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav. Pharmacol.* 2002;13:169-188.
- Yamada K., Iida R., Miyamoto Y., Saito K., Sekikawa K., Seishima M., Nabeshima T. Neurobehavioral alterations in mice with a targeted deletion of the tumor necrosis factor-alpha gene: implications for emotional behavior. *J. Neuroimmunol.* 2000;111(1/2):131-8.

Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом гена *Kaiso*

В.С. Коростина¹, А.В. Куликов^{2,3}

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Каизо является метил-ДНК связывающим белком и участвует в эпигенетической регуляции экспрессии генов. С помощью домена «цинковые пальцы» Каизо связывается с метилированной ДНК и привлекает к ней репрессивные комплексы за счет взаимодействия ВТВ/POZ домена, например, с корепрессором NCoR в комплексе с гистоновой деацетилазой, что приводит в конечном итоге к репрессии транскрипции. Были получены мыши с нокаутом гена *Kaiso* (KO) в геноме линии C57BL/6 (WT). В данной статье мы сравнивали поведенческие особенности половозрелых самцов мышей WT и KO в классической батарее тестов «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание». Мы показали, что нокаут по гену *Kaiso* приводит к повышению двигательной и исследовательской активностей в тесте «открытое поле». Мыши KO больше времени проводили в центре по сравнению с животными WT. Не было установлено влияние нокаута по гену *Kaiso* на тревожность мышей в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». В то же время нокаут по гену *Kaiso* оказывал выраженный антидепрессантный эффект в тесте «принудительное плавание»: мыши KO в отличие от животных WT не демонстрировали депрессивно-подобного замирания. Полученные данные являются первым свидетельством участия белка Каизо в регуляции функции нервной системы и поведения. Мыши KO являются новой и перспективной моделью для изучения генетических, молекулярных и нейробиологических механизмов эпигенетической регуляции функции нервной системы и поведения.

Ключевые слова: ген *Kaiso*; нокаутные мыши; открытое поле; приподнятый крестообразный лабиринт; принудительное плавание.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Коростина В.С., Куликов А.В. Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом гена *Kaiso*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):399-403. DOI 10.18699/VJ15.051

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Korostina V.S., Kulikov A.V. Behavioral phenotyping of *Kaiso*-deficient mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):399-403. DOI 10.18699/VJ15.051

DOI 10.18699/VJ15.051

УДК 573:575:57.02

Поступила в редакцию 07.06.2015 г.

Принята к публикации 03.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: v_kulikov@bionet.nsc.ru

Behavioral phenotyping of *Kaiso*-deficient mice

V.S. Korostina¹, A.V. Kulikov^{2,3}

¹ Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

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

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Kaiso is a methyl DNA-binding protein, which participates in the epigenetic regulation of gene expression. It binds methylated DNA with its zinc-finger domain and recruits repressive protein complexes to the methylated DNA fragments by the interaction of the BTB/POZ domain with the complex of NCoR corepressor and histone deacetylase, thereby performing transcription repression. A *Kaiso*-deficient mouse strain (KO) with the C57BL/6 strain background has been bred. Here we compare the behavior of KO mice and wild-type control C57BL/6 mice (WT) in the classic battery of behavioral tests, including the open field, elevated plus maze, and forced swim tests. We have shown that knockout of the *Kaiso* gene increases the locomotory and exploratory activities of KO mice in the open field test. *Kaiso*-deficient mice spend more time in the center of the open field than WT mice. No effect of *Kaiso* gene knockout on anxiety-related behavior has been observed in the elevated plus-maze. However, *Kaiso* gene deficiency produces a pronounced antidepressant-like effect in the forced swim test: Unlike WT mice, KO mice do not show any depressive-like freezing in this test. These results are the first piece of experimental evidence for the involvement of *Kaiso* protein in the regulation of brain functioning and behavior. The *Kaiso*-deficient strain is a new and promising model of the genetic, molecular, and neuronal mechanisms mediating the epigenetic regulation of brain functions and behavior.

Key words: *Kaiso* gene; knockout mice; open field; elevated plus maze; forced swim.

Метилирование цитозинов является пострепликационной модификацией ДНК и играет важную роль в процессе контроля экспрессии генов у позвоночных. Одной из основных функций метилирования является фиксация транскрипционно неактивного состояния генов (Klose, Bird, 2006). Метилирование ДНК эукариот происходит в результате присоединения метильной группы к углероду, расположенному в положении 5-го пиримидинового кольца цитозина. Метилированные цитозины остаются метилированными на длительное время и могут надолго сохранять память о закономерностях эмбриональной генной активности (Bird, 2002). Стабильность метилированных цитозинов лежит в основе гипотезы об эпигенетической пластичности нейронов и долговременной памяти, которая предполагает, что следы событий в жизни сохраняются в виде различных модификаций ДНК (Lubin et al., 2011; Bali et al., 2011). Это происходит, в частности, благодаря специальным белкам, которые специфично узнают метилированные районы ДНК и привлекают к ним белковые комплексы, репрессирующие транскрипцию.

Молекулярный механизм такой репрессии включает mCpG-связывающие белки, которые связываются с метилированными mCpG динуклеотидами и создают неблагоприятную для транскрипции конформацию ДНК (Wade, 2001; Fun, Hutnick, 2005; Klose, Bird, 2006). Выделяют две группы mCpG-связывающих белков, содержащих метил-ДНК связывающий домен (MBD) и Каизо. Первая группа включает белки MBD1, MeCP2, MBD2, MBD3, MBD4, которые участвуют во многих процессах: в контроле стабильности генома, раннем эмбриональном развитии, созревании нейронов, дифференцировке Т-клеток и др. (Hendrich et al., 2001). Мутации в гене *MeCP2*, нарушающие функцию белка, у человека приводит к Rett-синдрому, регрессу психического развития и необратимым нарушениям мозга (Roux, Villard, 2010). Нокаут *MeCP2* у мышей также ведет к значительным нейрональным нарушениям, которые сопровождаются снижением двигательной активности (Tropea et al., 2009).

Другим белком, взаимодействующим с метилированными mCGmCG, является Каизо – член семейства белков VTB/POZ. Белок Каизо содержит два функциональных домена: N-концевой VTB/POZ домен и три «цинковых пальца» типа C₂H₂ на C-конце. Белок Каизо взаимодействует с p120-катенином, который стабилизирует белок E-кадгерин, участвующий в клеточной адгезии, и является преимущественно цитоплазматическим белком (Daniel, 1999, 2007). Своими цинковыми пальцами Каизо связывается с метилированной ДНК (Filion et al., 2006) и привлекает к ней репрессивные комплексы за счет взаимодействия VTB/POZ домена, например, с корепрессором NCoR в комплексе с гистоновой деацетилазой (Yoon et al., 2003). Нокаут гена *Kaiso* у мышей обуславливает устойчивость к возникновению рака кишечника в модели APC/Min (Prokhortchouk et al., 2006). Это наблюдение свидетельствует о том, что Каизо может действовать как онкоген и согласуется с данными о том, что Каизо связывается и подавляет экспрессию метилированных опухолевых супрессоров и генов, участвующих в репарации при раке прямой кишки (Lopes et al., 2008). мРНК белка Каизо обна-

ружена в различных органах мыши, а также в клеточных линиях, полученных из кишки, легких, простаты и почек (Daniel, 1999). Показано, что белок Каизо экспрессируется в мозжечке, обонятельных луковицах, коре и гиппокампе мыши (Della Ragione et al., 2006; Shumskaya et al., 2015). Можно предположить участие гена *Kaiso* в эпигенетической регуляции поведения.

Целью данной работы было изучение участия белка Каизо в регуляции двигательной активности, тревожности и депрессивно-подобного поведения. Для этого сравнивали поведение мышей с нокаутом гена *Kaiso* (KO) и животных дикого типа (WT) в стандартной батарее лабораторных тестов, включающей тесты «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание».

Материалы и методы

Животные

Исследования проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). Опыты проводили на половозрелых самцах мышей линий C57BL/6 (WT, $n = 15$) и C57BL/6/*Kaiso* (KO, $n = 10$). Последняя линия была выведена Е.Б. Прохорчуком (Prokhortchouk et al. 2006) и передана в SPF-виварий ИЦиГ СО РАН из питомника лабораторных животных РАН «Пушино» (г. Пушкино, Россия). Все животные были в возрасте 10 нед и весили $28,5 \pm 1$ г. С момента отсадки от матерей мыши содержались в группах по 6 животных в клетках $40 \times 25 \times 15$ см в стандартных лабораторных условиях при 14-часовом световом режиме и температуре 22 °С. Полноценный корм и чистую воду получали без ограничения. За два дня до экспериментов животных изолировали в клетках того же размера для уменьшения влияния. Все эксперименты проводились во время светлой фазы (10-00–13-00). 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.).

Генотипирование. Мы проверяли генотип каждого из 25 животных, задействованных в эксперименте. Геномную ДНК выделяли из кончика хвоста (1 см) исследуемого животного солевым методом. Генотипирование проводили с использованием следующих последовательностей праймеров: *Kaiso* LS3 (5'GACACACAGTCAAAAAGCTAGTG 3'); *Kaiso* VTBrev (5'AGGCTGAAAGGATGTTCCSTATG 3') и *Kaiso*Rev (5'AGAAGGCTGATCTCCATTTGGA 3') при температуре отжига 59 °С. Размеры продуктов амплификации соответствовали 338 п. о. (WT, *Kaiso* LS3 – *Kaiso* VTBrev) и 403 п. о. (KO, *Kaiso* LS3 – *Kaiso*Rev).

Тестирование поведения. Для тестирования поведения использовался программно-аппаратный комплекс EthoStudio, созданный в ФГБУН «Институт автоматизации и электрометрии СО РАН» и адаптированный для SPF-вивария. Этот комплекс включал стенд для установки арен, освещение и цифровую видеокамеру Panasonic, присоединенную к компьютеру через интерфейс IEEE1394. В тестах «открытое поле» и «принудительное плавание»

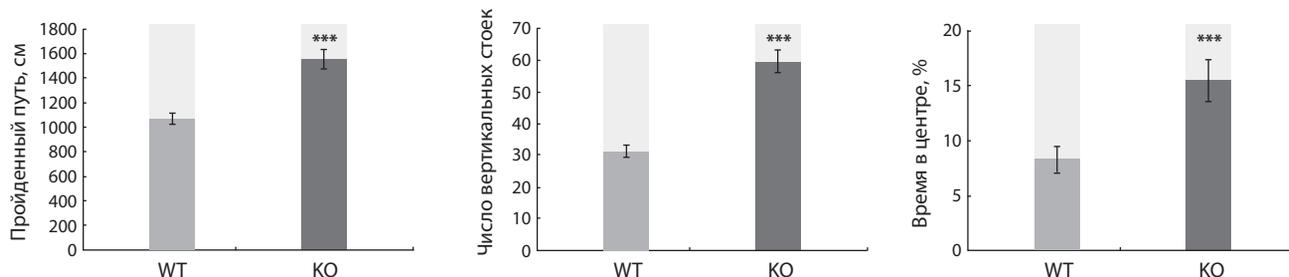


Рис. 1. Пройденный путь, число вертикальных стоек и время в центре в тесте «открытое поле» у мышей дикого типа (WT) и с нокаутом гена *Kaiso* (KO).

*** – $p < 0,001$ по сравнению с WT.

Поведение мышей линий WT и KO в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

Показатель	WT ($n = 15$)	KO ($n = 10$)	F
Число переходов	$14,6 \pm 1,7$	$21,6 \pm 1,7$	$F_{1,23} = 7,9, p < 0,01$
Время в центре, %	$32,1 \pm 4,8$	$52,3 \pm 4,2$	$F_{1,23} = 8,9, p < 0,01$
Латентное время захода в открытые рукава, с	$132,6 \pm 31,8$	$110,6 \pm 42,5$	$F_{1,23} < 1$
Число заходов в открытые рукава	$2,27 \pm 0,59$	$2,7 \pm 0,82$	$F_{1,23} < 1$
Время в открытых рукавах, %	$8,4 \pm 2,8$	$15,9 \pm 7,4$	$F_{1,23} = 1,2, p > 0,05$

использовали обращенное освещение, когда источник света помещался под ареной. В проходящем свете животное любого окраса выглядело как темный силуэт, контрастирующий с фоном (Kulikov et al., 2008). В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» использовали измерение в отраженном свете, когда лабиринт освещали сверху рассеянным светом. Это позволяло автоматически трассировать животное черной масти в открытых рукавах и центре лабиринта. Изображения животного с частотой 10 кадров/с обрабатывались программой EthoStudio, автоматически вычислялся путь, пройденный животным, и создавалась карта пространственного распределения ассоциированных с животным пикселей. Вертикальные стойки регистрировал наблюдатель с помощью нажатий на клавишу (Kulikov et al., 2008).

Тест «открытое поле» проводили на круглой арене диаметром 40 см с полупрозрачным полом и бортиками высотой 25 см. Животное помещали у стенки арены, его движения автоматически трассировались в течение 5 мин. Автоматически оценивали пройденный путь (см) и время (%), проведенное в центральной части поля (20 см в диаметре). Количество вертикальных стоек фиксировал экспериментатор (Kulikov et al., 2008). После каждого животного арену протирали влажной и сухой салфетками.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» проводили в аппарате, состоящем из двух открытых (потенциально опасных) и двух закрытых (безопасных) рукавов размером 37×6 см, приподнятых на высоту 60 см над уровнем пола. Закрытые рукава были защищены бортиками высотой 20 см. Животное помещали в центр головой к одному из закрытых рукавов, его движения в открытых рукавах и центре автоматически трассировали в течение 5 мин. Автоматически определяли число переходов через центр, латентное время захода в открытые рукава (с),

число заходов в открытые рукава, время (%), проведенное в открытых рукавах и центре (Kulikov et al., 2014). После каждого животного лабиринт протирали влажной и сухой салфетками.

В тесте «принудительное плавание» мышью помещали в цилиндрический стеклянный резервуар (15×25 см), заполненный на $3/4$ водой ($t = 25^\circ\text{C}$), и ее движения автоматически трассировали в течение 6 мин. Оценивали латентное время первого замирания (с) и суммарное время неподвижности (с) за последние 4 мин (Kulikov et al., 2010). Воду меняли после каждого животного.

Статистика. Результаты представляли как средние \pm ошибка среднего и сравнивали с помощью однофакторного ANOVA.

Результаты

Результаты генотипирования показали, что все 15 мышей WT и 10 мышей KO имели соответствующий генотип.

Мыши KO в тесте «открытое поле» проходили большее расстояние ($F_{1,23} = 34,98, p < 0,0001$), чаще демонстрировали вертикальные стойки ($F_{1,23} = 50,23, p < 0,0001$) и проводили больше времени в центре ($F_{1,23} = 11,16, p < 0,003$) по сравнению с животными WT (рис. 1).

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» мыши KO чаще пересекали центр и проводили больше времени в центре по сравнению с животными WT. В то же время мыши KO и WT не различались по латентному времени захода в открытые рукава, количеству заходов и времени, проведенному в открытых рукавах (таблица).

В тесте принудительного плавания у мышей KO латентное время до первого замирания было вдвое больше ($F_{1,23} = 33,23, p < 0,0001$), а суммарное время неподвижности было втрое короче ($F_{1,23} = 54,72, p < 0,0001$) по сравнению с животными WT (рис. 2).

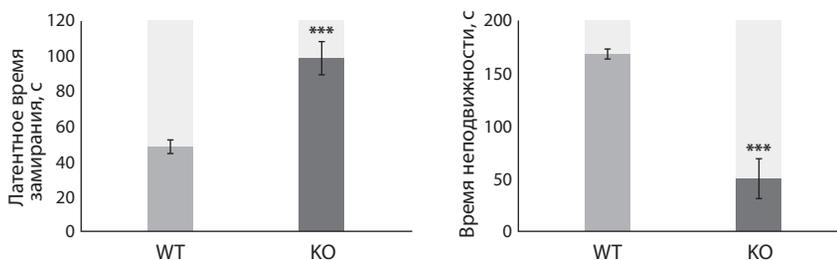


Рис. 2. Латентное время неподвижности и общее время неподвижности в тесте «принудительное плавание» у мышей дикого типа (WT) и с нокаутом гена *Kaiso* (KO).

*** – $p < 0,001$ по сравнению с WT.

Обсуждение

В данной работе впервые исследовано влияние нокаута гена *Kaiso* (KO) на поведение мышей в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание». Эти тесты входят в батарею тестов, рекомендованных для обязательного поведенческого фенотипирования нокаутных и трансгенных мышей (Crawley, 2008).

Тест «открытое поле» является стандартным для исследования двигательной (пройденное расстояние), исследовательской (число вертикальных стоек) активностей и тревожности (время в центре) в условиях мягкого стресса (новая обстановка и интенсивное освещение) (Denenberg, 1969; Prut, Belzung, 2003; Tecott, 2003; Standford, 2007). Увеличение пройденного пути и числа вертикальных стоек у мышей KO можно интерпретировать, соответственно, как увеличение их двигательной и исследовательской активности по сравнению с животными WT. Мыши избегают ярко освещенных и открытых пространств и предпочитают держаться ближе к стенке открытого поля. Поэтому увеличение времени в центре открытого поля у мышей KO можно интерпретировать как некий анксиолитический эффект нокаута гена *Kaiso*.

Для подтверждения результатов о пониженной тревожности, полученных в «открытом поле», мы использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт», который является основным для изучения тревожности. В нем мыши избегают появляться в открытых рукавах из-за высокого риска падения и предпочитают находиться в защищенных закрытых рукавах (Pellow et al., 1985; Belzung, Griebel, 2001; Wahlstein et al., 2003; Milner, Crabbe, 2008). Мы обнаружили, что мыши KO были более активны и чаще пересекали центр по сравнению с мышами WT. Это хорошо согласуется с высокой двигательной и исследовательской активностью у мышей KO в тесте «открытое поле». Мыши обеих линий не различались по времени пребывания в открытых рукавах. Это свидетельствует об отсутствии различий в уровне тревожности между мышами KO и WT.

Возникает противоречие между сниженной тревожностью мышей KO в тесте «открытое поле» и отсутствием эффекта нокаута гена *Kaiso* на тревожность в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Мы полагаем, что мыши обеих линий не различаются по степени их тревожности, а наблюдаемое увеличение времени пребывания в центре в тесте «открытое поле» отражает скорее повышенную двигательную активность, чем сниженную тревожность мышей KO.

Тест «принудительное плавание» широко используется для скрининга клинических антидепрессантов, поскольку большинство клинически эффективных антидепрессантов снижают время неподвижности в данном тесте (Porsolt et al., 1977; Willner, 1990; Willner, Mitchell, 2002; Cryan, Mombereau, 2004). В то же время у мышей KO практически не наблюдаются периоды неподвижности – они непрерывно плавают и ищут способ выбраться из сосуда. Это можно интерпретировать как некий антидепрессантный эффект нокаута гена *Kaiso*. Однако следует помнить, что эта интерпретация уменьшения времени неподвижности в тесте «принудительное плавание» верифицирована только для фармакологических экспериментов. Поэтому следует с большой

осторожностью интерпретировать снижение времени неподвижности в тесте у мышей KO как некий «антидепрессантный» эффект нокаута гена *Kaiso*. Снижение времени неподвижности может быть также и следствием высокой двигательной активности мышей KO.

Таким образом, приведенные выше тесты показали, что нокаут гена *Kaiso* увеличивает локомоторную и, возможно, исследовательскую активность у мышей. Молекулярный механизм участия гена и белка Каизо в регуляции двигательной активности мышей не ясен. Белок Каизо может быть вовлечен в вызванное метилированием снижение экспрессии генов, активирующих двигательную активность. В этом случае отсутствие белка Каизо вызовет увеличение экспрессии этих генов и соответственное увеличение двигательной активности у мышей KO.

Стоит отметить, что нокаут гена, кодирующего транскрипционный репрессор MeCP2, который аналогично *Kaiso* связывается с метилированными цитозинами и подавляет экспрессию генов, вызывает, напротив, снижение двигательной активности у мышей (Trorea et al., 2009).

В данной работе впервые была обнаружена связь нокаута гена *Kaiso* с повышенной двигательной активностью мышей. В результате представленную линию мышей с нокаутом гена *Kaiso* можно предложить как модель для дальнейших исследований роли белка Каизо в регуляции функций нервной системы и поведения.

Благодарности

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта VI53.2.2 и поддержана грантом РФФИ № 14-04-00170.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Bali P., Im H.I., Kenny P.J. Methylation, memory and addiction. *Epigenetics*. 2011;6: 671-674.
- Belzung C., Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. *Behav. Brain Res.* 2001;125: 141-149.

- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16:6-21.
- Crawley J.N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron.* 2008;57:809-818.
- Cryan J.F., Mombereau C. In search of a depressive mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol. Psychiatry.* 2004;9:326-357.
- Dañiel J.M., Reynolds A.B. The catenin p-120 (ctn) interacts with *Kaiso*, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19:3614-3623.
- Daniel J.M. Dancing in and out of the nucleus: p120ctn and the transcription factor *Kaiso*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1772:59-68.
- Della Ragione F., Tiunova A., Vacca M., Strazzullo M., Gonzalez 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.
- Denenberg V.H. Open-field behavior in the rat: What does it mean? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1969;159:852-859.
- Filion G.J., Zhenilo S., Salozhin S., Yamada D., Prokhortchouk E., Defosse P.A. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:169-181.
- Fun G., Hutnick L. Methyl-CpG binding proteins in the nervous system. *Cell Res.* 2005;15:255-261.
- Hendrich B., Guy J., Ramsahoye B., Wilson V.A., Bird A. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev.* 2001;15:710-723.
- Klose R.J., Bird A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 2006;31:89-97.
- Kulikov A.V., Morozova M.V., Kulikov V.A., Kirichuk V.S., Popova N.K. Automated analysis of antidepressants' effect on the forced swim test. *J. Neurosci. Meth.* 2010;191:26-31.
- Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of special preference in the open field test with transmitted lighting. *J. Neurosci. Meth.* 2008;170:345-351.
- Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikova E.A., Volcho K.P., Khomenko T.M., Salakhutdinov N.F., Popova N.K. Antidepressant activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153): Comparison with classical antidepressants. *Lett. Drug Design Discov.* 2014;11:169-173.
- Lopes E.C., Valls E., Figueroa M.E., Mazur A., Meng F.G., Chiosis G., Laird P.W., Schreiber-Agus N., Grealley J.M., Prokhortchouk E., Melnick A. *Kaiso* contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Res.* 2008;68:7258-7263.
- 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.
- Milner L.C., Crabbe J.C. Three murine anxiety models: results from multiple inbred strain comparison. *Genes Brain Behav.* 2008;7:496-505.
- Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 1985;14:149-167.
- Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266:730-732.
- 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.
- Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;463:3-33.
- Roux J.C., Villard L. Biogenic amines in Rett syndrome: the usual suspects. *Behav. Genet.* 2010;40:59-75.
- Shumskaya V.S., Zhigalova N.A., Prokhorchouk A.V., Prokhorchouk E.B. Distribution of *Kaiso* protein in mouse tissues. *Histochem. Cell Biol.* 2015;143:29-43.
- Standford C. The open field test: reinventing the wheel. *J. Psychopharmacol.* 2007;21:134-135.
- Tecott L.H. The genes and brain of mice and men. *Am. J. Psychiatry.* 2003;160:646-656.
- Tropea D., Giacometti E., Wilson N.R., Beard C., McCurry C., Fu D.D., Flannery R., Jaenisch R., Sur M. Partial reversal of Rett syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106:2029-2034.
- Wade P.A. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays.* 2001;23:1131-1137.
- Wahlsten D., Rustay N.R., Metten P., Crabbe J.C. In search of a better mouse test. *Trends Neurosci.* 2003;26:132-136.
- Willner P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol. Ther.* 1990;45:425-455.
- Willner P., Mitchell P.J. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav. Pharmacol.* 2002;13:169-188.
- Yoon H.G., Chan D.W., Reynolds A.B., Qin J., Wong J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein *Kaiso*. *Mol. Cell.* 2003;12:723-734.

Репродуктивные эффекты нокаута гена фактора некроза опухолей (*TNF*) у мышей

С.О. Масленникова¹, Г.В. Концевая¹, М.А. Золотых¹, М.В. Анисимова¹, Н.А. Феофанова¹, М.П. Мошкин¹, С.А. Недоспасов^{2, 3}, Л.А. Герлинская¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия

Фактор некроза опухолей (*TNF*) является мультифункциональным цитокином, который играет важную роль в гомеостазе. При повышенных концентрациях этот цитокин может вызывать различные патофизиологические процессы, в частности негативно влиять и на разные звенья репродуктивного процесса. В физиологических концентрациях *TNF* обеспечивает поддержание баланса между апоптозом и выживаемостью мужских гамет. Широкое применение системной блокировки *TNF* при лечении ряда аутоиммунных заболеваний ставит вопрос о возможных последствиях такой терапии для репродуктивных функций человека. В данной работе у мышей с нокаутом *TNF* (*TNF*^{-/-}) были исследованы: поведенческие взаимодействия самцов с самками, сперматогенез, фертильная эффективность самцов и особенности эмбрионального развития потомков. Результаты репродуктивного фенотипирования мышей с нокаутом гена *TNF* показали, что данный цитокин вовлечен в регуляцию полового поведения, сперматогенеза, пре- и постимплантационного развития потомков. Полный генетический нокаут гена *TNF* снижает репродуктивную эффективность мышей, что выражается в меньшем числе жизнеспособных эмбрионов при внутривидовых скрещиваниях особей *TNF*^{-/-} по сравнению с таковыми при скрещиваниях животных дикого типа *TNF*^{+/+}. Причиной меньшей плодовитости является увеличение доимплантационных эмбриональных потерь при внутривидовых скрещиваниях мышей линии *TNF*^{-/-}. В свою очередь доимплантационные потери у самок *TNF*^{-/-} могут быть обусловлены азооспермией у самцов этого генотипа. Кроме того, исследованные генотипы различаются по чувствительности репродуктивной функции к стимулирующему влиянию самок. Взаимодействие с самками увеличивало концентрацию сперматозоидов в эпидидимисах самцов обеих генетических линий, причем наиболее выражено – у особей с нокаутом по гену *TNF*, что приводило к увеличению в эпидидимисах незрелых форм сперматозоидов. Полученные данные свидетельствуют о том, что сниженная экспрессия *TNF* может быть одной из причин бесплодия, а также указывают на возможные механизмы этого явления.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли (*TNF*); мыши с нокаутом *TNF*; сперматогенез; пре- и постнатальное развитие потомков; половое поведение.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Масленникова С.О., Концевая Г.В., Золотых М.А., Анисимова М.В., Феофанова Н.А., Мошкин М.П., Недоспасов С.А., Герлинская Л.А. Репродуктивные эффекты нокаута гена фактора некроза опухолей (*TNF*) у мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):404-409. DOI 10.18699/VJ15.052

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Maslennikova S.O., Kontsevaya G.V., Zolotykh M.A., Anisimova M.V., Feofanova N.A., Moshkin M.P., Nedospasov S.A., Gerlinskaya L.A. Reproductive effects of the tumor necrosis factor (*TNF*) deficiency in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):404-409. DOI 10.18699/VJ15.052

DOI 10.18699/VJ15.052

УДК 577.175.14

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

Принята к публикации 15.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

✉ e-mail: lgerlinskaya@gmail.com

Reproductive effects of the tumor necrosis factor (*TNF*) deficiency in mice

S.O. Maslennikova¹, G.V. Kontsevaya¹, M.A. Zolotykh¹, M.V. Anisimova¹, N.A. Feofanova¹, M.P. Moshkin¹, S.A. Nedospasov^{2, 3}, L.A. Gerlinskaya¹

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

² Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

TNF is a multifunctional cytokine that, at physiological concentrations, maintains the balance between apoptosis and survival of male germ cells and, at higher concentrations, has adverse effects on various stages of the reproductive process. Although anti-cytokine therapies have been used in millions of patients, the consequences of cytokine deficiency for reproductive functions are poorly understood and need attention. In this work, we have studied behavioral interactions between males and females, spermatogenesis, male fertility, and embryonic developmental characteristics of the progeny in *TNF* α knockout mice (*TNF*^{-/-}). We have demonstrated that *TNF* is involved in the regulation of sexual behavior, spermatogenesis, pre- and postimplantation development. Complete *TNF* deficiency led to decreased reproductive efficiency: a lower number of viable embryos were observed in *TNF*^{-/-} mice than in wild-type mice. The decrease in fertility was caused by preimplantation embryo loss in *TNF*^{-/-} mice. Preimplantation loss in females might be caused by asospermia in *TNF*^{-/-} males. Additionally, the sensitivity of reproductive functions to female stimuli was different between *TNF*^{-/-} mice and wild-type mice, while interactions with females increased the concentrations of spermatozooids in both *TNF*^{-/-} and wild-type mice. Still higher levels were observed in knockout animals, which led to increase in the number of immature spermatozooids in epididymides.

Key words: Tumor necrosis factor (*TNF*); *TNF* knockout mice; spermatogenesis; pre- and postnatal development; sexual behavior

Иммунный ответ на инфекции или иные формы антигенной стимуляции может влиять на многие функции организма, включая процессы воспроизводства (Moshkin et al., 2000). Существенный вклад в это влияние вносят провоспалительные цитокины, в частности фактор некроза опухоли (TNF). В регуляции функции семенников TNF играет двойственную роль. С одной стороны, повышение концентрации этого цитокина в семенниках при воспалительном процессе стимулирует апоптоз (Riccioli et al., 2000; Perdichizzi et al., 2007; Theas et al., 2008). С другой стороны, TNF в физиологических концентрациях обеспечивает поддержание через Fas/Fas L систему баланс апоптоза и выживания клеток семенника (Riccioli et al., 2000; Pentikäinen et al., 2001), а также оказывает прямое положительное влияние на созревание половых клеток (Suominen et al., 2004; Pérez et al., 2013).

Не менее значимым для репродукции является участие TNF в регуляции центральной нервной системы. Так, увеличение концентрации TNF при воспалении или других заболеваниях головного мозга вызывает нейротоксический эффект, и его уровень коррелирует с проявлениями депрессивных симптомов (Perry et al., 2002; Prather et al., 2009; Raison et al., 2010) и агрессивным поведением (Zalcman, Siegel, 2006). Кроме того, активация TNF при воспалении верхних дыхательных путей вносит вклад в формирование обонятельной дисфункции (Sultan et al., 2011), что может существенно влиять на процессы химической коммуникации, играющей важную роль в половом поведении.

В подавляющем большинстве экспериментов и клинических наблюдений рассматриваются репродуктивные эффекты повышенной секреции провоспалительных цитокинов, имеющие место при инфекционных заболеваниях. Вместе с тем при широкой распространенности системной антицитокиновой терапии, в частности при аутоиммунных заболеваниях (Астраханцева и др., 2014; Друцкая и др., 2014), значимость дефицита цитокинов изучена в гораздо меньшей степени. В данной работе у мышей с нокаутом гена *TNF* (*TNF*^{-/-}) были исследованы поведенческие взаимодействия самцов с самками, сперматогенез, фертильная эффективность самцов и особенности эмбрионального развития потомков.

Материалы и методы

Животные и условия содержания. Исследование выполнено в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010), технологическая структура которого обеспечивает проведение экспериментов в строго контролируемых условиях среды: фотопериоде 14С:10Т, температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. Опыты выполнены на мышах линий *TNF*^{-/-} с полной делецией гена *TNF*, свободных от видоспецифических патогенов (specific pathogen free – SPF), полученных с помощью технологии эмбриональных стволовых клеток и переведенных на генетическую основу C57BL/6 путем возвратного скрещивания (Grivennikov et al., 2005). В качестве контрольной группы (дикий тип) были использованы лабораторные мыши линии C57BL/6, которые обозначены далее как *TNF*^{+/+}. Самцы в возрасте 8–10 нед были рассажены

в клетки (OptiMice) по одному за 5 дней до начала эксперимента. Самок содержали в тех же условиях по 5 особей в клетке. Корм (SNIFF, Германия) и воду давали *ad libitum*. Корм и обеспыленную подстилку предоставляли животным после автоклавирования. Всего для исследования морфологии семенников, числа и подвижности сперматозоидов у самцов, содержащихся изолированно, было использовано по 8 особей каждой линии. При анализе полового поведения, эффективности покрытий и изменений после содержания с самками морфологии семенников и показателей сперматогенеза было исследовано 8 самцов и 16 самок *TNF*^{-/-}, а также 8 самцов и 16 самок *TNF*^{+/+}. Протокол эксперимента был рассмотрен и одобрен комиссией по биоэтике ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Половое поведение. В клетку самца после отключения света (15 ч местного времени) подсаживали двух самок и в течение 10 мин вели видеозапись их поведенческих взаимодействий.

Спаривание. В первый день эксперимента к каждому самцу линий *TNF*^{-/-} и *TNF*^{+/+} сразу после отключения света подсаживали по 2 виргинные самки и содержали совместно в течение 5 сут. На следующее утро (9–10 ч) и далее ежедневно до окончания периода совместного содержания самок осматривали на наличие вагинальной пробки. При обнаружении таковой самок отсаживали в отдельные клетки. День отсадки считали нулевым днем беременности. По окончании периода спариваний самок, не покрытых самцами, отсаживали в индивидуальные клетки и содержали не менее 3 нед для регистрации родов. Самцов декапитировали для взятия семенников и эпидидимисов.

Сперматозоиды. После декапитации у самцов извлекали эпидидимис и помещали в 500 мкл солевого раствора Хенкса без кальция и магния (Sigma) при +37 °С. Каудальный отдел эпидидимиса измельчали и помещали в инкубатор при +37 °С на 20 мин. Полученную суспензию фильтровали через капроновый фильтр и 15 мкл помещали на предметное стекло 2-cell chamber (80 мкм). Для определения количества и подвижности сперматозоидов использовали автоматический анализатор спермы (Mouse Trax – Hamilton Thorne). В каждом образце было исследовано 5 полей при увеличении ×4. Все процедуры проводили при +37 °С.

Морфология семенников. Семенники фиксировали в нейтральном 10 %-м формалине. Фиксированные образцы обезжизняли последовательным проведением их через спирт в возрастающей концентрации и ксилол (Thermo Scientific, Великобритания). Заливку парафиновых блоков проводили на заливочной станции HistoStar (Thermo Scientific, Великобритания). Для приготовления срезов толщиной 3 мкм использовали ротационный полуавтоматический микротом Microm HM 340E (ThermoScientific, Великобритания). Срезы освобождали от парафина, окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином (Волкова, Елецкий, 1982).

Подсчет сперматогоний, сперматоцитов и сперматид I порядка производили в 15 произвольно выбранных поперечных срезах извитых канальцев. Данные по подсчету клеток каждого типа были усреднены по каждому семеннику.

Беременность и развитие зародышей. Самок декапитировали на 16-е сут беременности и взвешивали эмбрионы и их плаценты. Для оценки репродуктивных характеристик подсчитывали количество овулировавших яйцеклеток (число желтых тел), общее число эмбрионов (число мест имплантации) и число живых эмбрионов без видимых признаков нарушений развития.

Статистика. Для определения влияния генотипа и условий содержания на морфофункциональные характеристики гонад использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA, main effects). При сравнении двух средних применяли *t*-критерий Стьюдента. Показатели плодовитости и эмбриональных потерь сравнивали на основе критерия χ^2 . Взаимозависимость массы и числа эмбрионов оценивали с помощью коэффициента линейной корреляции. Результаты представлены как средняя \pm ошибка средней.

Результаты

Половое поведение. Анализ поведенческих актов, проявляемых самцами при подсадке самок, показал, что самцы линии TNF^{-/-} тратят существенно меньше времени на назо-генитальные обнюхивания по сравнению с самцами TNF^{+/+} (рис. 1). Вместе с тем продолжительность назо-назальных обнюхиваний была одинаковой у мышей обеих линий. По другим формам полового поведения также не выявлено статистически значимых различий между линиями TNF^{+/+} и TNF^{-/-} (данные не приведены).

Семенники и эпидидимисы. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA, main effects) показал, что

на индексы семенников и эпидидимисов значимо влияли генотип самцов ($F_{1,29} = 33,42, p < 0,001$; $F_{1,29} = 14,83, p < 0,001$ соответственно) и условия их содержания перед взятием материала ($F_{1,29} = 12,72, p < 0,001$; $F_{1,29} = 26,27, p < 0,001$ соответственно). При этом самцы линии TNF^{-/-} имели большие значения индекса семенников ($6,99 \pm 0,13$) и индекса эпидидимисов ($1,67 \pm 0,10$) по сравнению с самцами TNF^{+/+} ($6,85 \pm 0,19$ и $1,34 \pm 0,06$). После содержания с самками оба показателя возрастали у самцов линии TNF^{+/+}. У линии TNF^{-/-} это увеличение было статистически значимым только для индекса эпидидимисов (табл. 1).

Сперматозоиды. Генотип самца и условия его содержания перед взятием образцов семени существенно влияли на основные характеристики сперматозоидов (табл. 2). Концентрация сперматозоидов в эпидидимисах самцов дикого типа TNF^{+/+} ($112,6 \pm 22,7$ млн/мл) более чем в два раза превышала таковую у самцов TNF^{-/-} ($49,8 \pm 10,4$ млн/мл, табл. 2). При этом содержание с самками увеличивало количество сперматозоидов в эпидидимисах, прежде всего, у самцов с нокаутом TNF, у которых накопление сперматозоидов сочеталось со статистически значимым увеличением скорости их перемещения (табл. 3). Сперматозоиды мышей линии TNF^{+/+} отличались от таковых у линии TNF^{-/-} меньшей вытянутостью ($56,7 \pm 2,6$ и $61,9 \pm 2,8$ соответственно), но большими размерами ($6,89 \pm 0,61$ и $4,74 \pm 0,48$ соответственно) головки (табл. 2). Содержание с самками влияло на форму и размеры головок сперматозоидов (табл. 2). У самцов обеих генетических линий головки имели бо-

Таблица 1. Индексы семенников и эпидидимисов

Линия	Индекс семенников, мг/г <i>n</i> = 8	Индекс эпидидимисов, мг/г <i>n</i> = 8
Содержание изолированное		
TNF ^{+/+}	$5,32 \pm 0,21$	$1,14 \pm 0,04$
TNF ^{-/-}	$6,83 \pm 0,15$	$1,43 \pm 0,04$
Содержание с самками		
TNF ^{+/+}	$6,39 \pm 0,17^{***}$	$1,53 \pm 0,07^{***}$
TNF ^{-/-}	$7,16 \pm 0,20$	$1,92 \pm 0,15^{**}$

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с самцами той же линии, содержащимися изолированно от самок (*t*-тест Стьюдента).

Таблица 2. Влияние генотипа и условий содержания на основные характеристики сперматозоидов

Признак	Факторы	$F_{1,29}$	<i>p</i>
Концентрация сперматозоидов	Генотип	6,95	= 0,01
	Условия содержания	3,90	= 0,057
Скорость движения	Генотип	0,33	= 0,57
	Условия содержания	15,78	< 0,001
Элонгация (вытянутость) головки	Генотип	4,14	= 0,05
	Условия содержания	39,69	< 0,001
Размер головки	Генотип	16,23	< 0,001
	Условия содержания	35,12	< 0,001

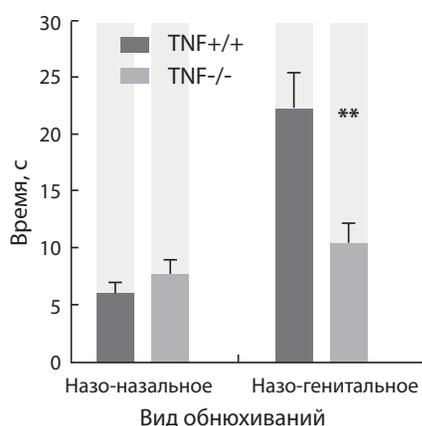


Рис. 1. Продолжительность назо-назальных и назо-генитальных обнюхиваний при взаимодействии самцов и самок линий TNF+/+ и TNF-/. ** $p < 0,01$ (*t*-тест Стьюдента).

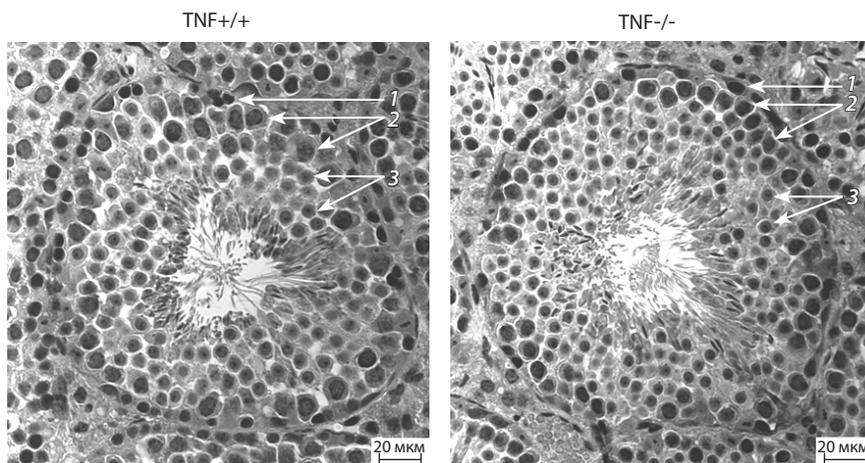


Рис. 2. Гистологический анализ семенников TNF+/+ и TNF-/. Срезы ткани окрашены гематоксилином и эозином. Стадии развития сперматозоидов в семенных канальцах: 1 – сперматогонии; 2 – сперматоциты; 3 – сперматиды I порядка.

Срезы ткани окрашены гематоксилином и эозином. Стадии развития сперматозоидов в семенных канальцах: 1 – сперматогонии; 2 – сперматоциты; 3 – сперматиды I порядка.

Таблица 3. Морфофункциональные характеристики сперматозоидов

Линия	Концентрация, млн/мл $n = 8$	Скорость, мкм/сек (VCL) $n = 8$	Элонгация головки $n = 8$	Размер головки, мкм ² $n = 8$
Содержание изолированное				
TNF+/+	104,6 ± 43,39	66,3 ± 6,04	62,0 ± 4,62	5,49 ± 0,96
TNF-/-	10,7 ± 2,28	56,3 ± 3,35	72,7 ± 0,53	2,97 ± 0,17
Содержание с самками				
TNF+/+	120,6 ± 17,53	75,8 ± 3,99	51,5 ± 0,62*	8,29 ± 0,39*
TNF-/-	88,9 ± 4,35***	80,9 ± 2,10***	51,1 ± 0,69***	6,50 ± 0,22***

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ по сравнению с самцами той же линии, содержавшимися изолированно от самок (*t*-тест Стьюдента).

лее округлую форму (снижение элонгации) и большие размеры (табл. 3).

Гистология семенников. На препаратах семенников выделяли три типа различающихся по степени зрелости сперматогенных клеток – сперматогонии, сперматоциты и сперматиды (рис. 2). Их относительное число существенно не различалось у самцов TNF+/+ и TNF-/. Но у самцов с нокаутом по *TNF* было выявлено существенное сокращение относительного числа сперматогониев после их 5-суточного содержания с самками по сравнению с таковым при изолированном содержании (рис. 3).

Фертильные покрытия. Критерием фертильного покрытия являлось наличие у самок овулировавших яйцеклеток или факта родов после отсадки в конце эксперимента. Самцы линии TNF+/+ покрыли 14 самок из 16, а самцы TNF-/- – 13 из 16. Несмотря на одинаковую эффективность фертильных покрытий, общее число живых эмбрионов у мышей, дефицитных по *TNF*, было существенно меньше, чем у мышей дикого типа – 56 и 87 соответственно, $\chi^2 = 4,09$; $p = 0,043$. Причиной меньшей плодовитости мышей линии TNF-/- были большие доимплантационные и общие эмбриональные потери по сравнению с линией TNF+/+ (рис. 4).

Масса эмбрионов. Масса вынашиваемых эмбрионов была выше у самок TNF-/- (637,7 ± 6,6 мг) по сравнению с таковой (601,7 ± 7,3 мг) у самок TNF+/+ ($p < 0,001$). Анализ взаимозависимости числа вынашиваемых эмбрионов и их массы показал, что общепринятая отрицательная корреляция между этими признаками соблюдается на уровне тенденции только у мышей дикого типа TNF+/+ ($r = -0,22$, $p = 0,06$). У беременных самок с нокаутом *TNF*, наоборот, выявлена статистически значимая положительная корреляция числа эмбрионов и их массы ($r = -0,40$, $p = 0,002$). В результате при многоплодной беременности (8–9 зародышей) масса эмбрионов TNF-/- превосходила таковую эмбрионов TNF+/+ (рис. 5).

Обсуждение

Как следует из наших данных, полный нокаут гена *TNF* снижает репродуктивную эффективность мышей, что выражается в сокращении числа жизнеспособных эмбрионов при внутрилинейных скрещиваниях особей TNF-/- по сравнению со скрещиваниями животных дикого типа (TNF+/+). Различная продуктивность млекопитающих определяется их конкурентными преимуществами на разных стадиях репродуктивного цикла, начиная от вы-

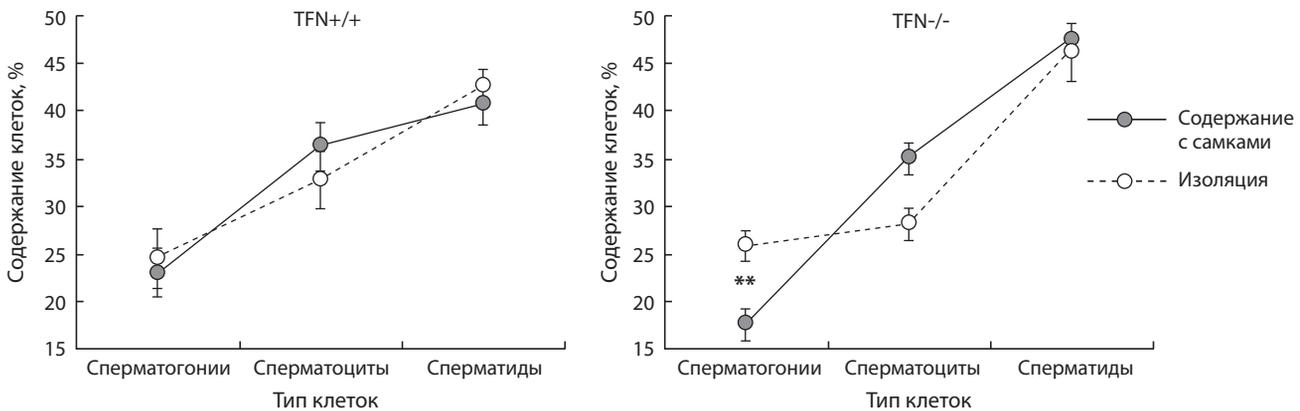


Рис. 3. Относительное содержание сперматогенных клеток в семенниках самцов мышей разных линий при содержании в изоляции или с половозрелыми самками. ** $p < 0,01$ при сравнении между группами изолированного содержания и содержания с самками (*t*-тест Стьюдента).

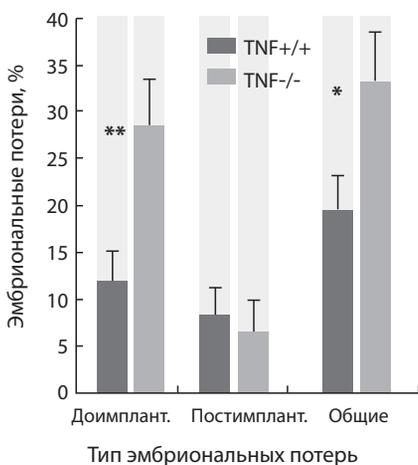


Рис. 4. Эмбриональные потери при внутривидовых скрещиваниях мышей линий *TNF+/+* и *TNF-/-*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ при сравнении линий (критерий χ^2).

бора партнера и до выкармливания потомков. Несмотря на пониженный интерес к половому партнеру, индикатором которого служит продолжительность обнюхивания генитальной области, самцы с дефицитом *TNF* покрыли 81,2 % подсаженных к ним самок, что практически не отличается от фертильных покрытий, зарегистрированных у мышей дикого типа (87,5 %). Но у самок *TNF-/-* были зафиксированы значительно большие по сравнению с самками дикого типа эмбриональные потери, особенно на доимплантационной стадии развития.

Доимплантационная гибель зародышей относится к числу ведущих причин бесплодия. На ее величину существенно влияют количественные

(азоспермия) и качественные характеристики сперматозоидов (Bulletti et al., 1996; Wosnitzer et al., 2014). Средняя концентрация сперматозоидов в эпидидимисах самцов *TNF-/-* до подсадки самок была почти в 10 раз меньше, чем у самцов *TNF+/+*. Взаимодействие самцов с самками увеличивало концентрацию сперматозоидов в эпидидимисах самцов обеих генетических линий, причем рост концентрации сперматозоидов был наиболее выраженным у самцов с нокаутом по гену *TNF*. Поскольку продолжительность совместного содержания с самками составляла всего 5 сут, что при более чем 2-недельном цикле гаметогенеза совершенно недостаточно для обогащения эпидидимисов вновь образованными сперматозоидами, то увеличение их концентрации в эпидидимисах можно объяснить ускоренным выходом из извитых канальцев менее зрелых гамет. В пользу этого предположения свидетельствует увеличение при содержании самцов с самками скорости движения сперматозоидов, которое было наиболее выраженным и статистически значимым у *TNF-/-* самцов. Кроме того, у этих же самцов взаимодействие с самками ускоряло переход от незрелых к более зрелым формам сперматогенных клеток и выразалось в статистически значимом снижении доли сперматогониев. Еще одно доказательство накопления в эпидидимисах менее зрелых сперматозоидов дает анализ формы головки, которая в образцах семени, взятых после взаимодействия с самками, характеризовалась меньшей вытянутостью при большей площади максимального сечения. Оба признака характерны для менее зрелых форм сперматозоидов (Agarwal et al., 2003; Ramyn et al., 2013).

Следует отметить, что существенное снижение концентрации сперматозоидов при нокауте гена *TNF* отмечено также Suh с соавт. (2008), которое авторы объясняют значительным падением концентрации тестостерона и уменьшением экспрессии в семенниках генов, вовлеченных в процессы стероидогенеза. Как известно, тестостерон инициирует и поддерживает сперматогенез (Holdcraft, Braun, 2004). Более того, при низком уровне тестостерона в семенниках уменьшается элонгация сперматид, что свидетельствует о подавлении процессов созревания (McLachlan et al., 1994).

Итак, причиной значительной доимплантационной гибели эмбрионов при внутривидовых скрещиваниях мышей с дефицитом *TNF* может быть азоспермия, наблюдаемая у самцов *TNF-/-* до подсадки к ним самок, а также увеличение доли незрелых форм сперматозоидов, которое отмечается после подсадки к этим самцам половозрелых самок.

Снижение плодовитости у *TNF*-мутантных мышей сочеталось с увеличением массы эмбрионов. Этот эффект не является простым следствием увеличения массы зародышей при уменьшении их числа, поскольку статистически значимые различия между линиями *TNF-/-* и *TNF+/+* имели место, прежде всего, при многоплодной беременности. Механизмы, обуславливающие большую массу эмбрионов, при дефиците *TNF* требуют специального изучения. Сегодня можно отметить лишь то, что повышенная экспрессия данного цитокина

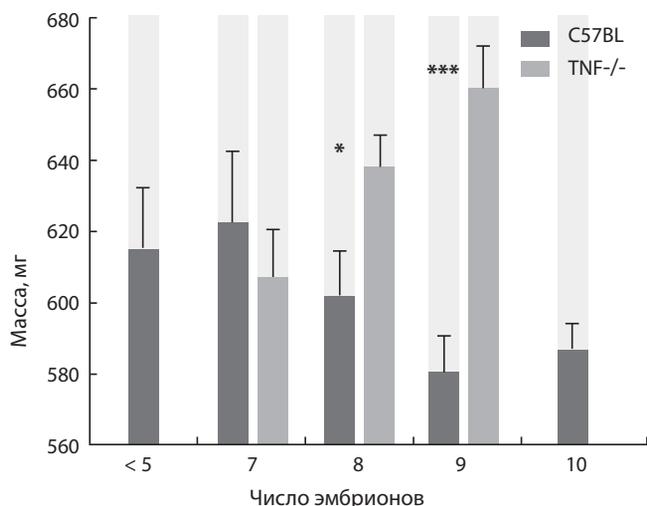


Рис. 5. Масса эмбрионов у самок линий TNF^{+/+} и TNF^{-/-}, вынашивающих разное число зародышей.

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (t-тест Стьюдента).

может усиливать процессы апоптоза, тормозящие рост эмбрионов (Wride, Sanders, 1995).

Таким образом, репродуктивное фенотипирование мышей с нокаутом гена *TNF* показывает, что данный цитокин вовлечен в регуляцию полового поведения, сперматогенеза, пре- и постимплантационного развития эмбрионов. Наши данные должны быть учтены при назначении длительной анти-TNF терапии пациентам, находящимся в репродуктивном возрасте.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), гранта РФФИ № 14-04-32144 и программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Астраханцева И.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Современная антицитокиновая терапия аутоиммунных заболеваний. *Биохимия*. 2014;12:1605-1616.
- Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина, 1982.
- Друцкая М.С., Ефимов Г.А., Зварцев Р.В., Чашина А.А., Чудаков Д.М., Тиллиб С.В., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Экспериментальные модели артрита, патогенез которых связан с экспрессией фактора некроза опухолей (TNF). *Биохимия*. 2014;12:1648-1656.
- Agarwal A., Sharma R.K., Nelson D.R. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *J. Androl.* 2003;24(3):343-352.

- Bulletti C., Flamigni C., Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum. Reprod. Update*. 1996;2(2):P.118-136.
- Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Marakusha B.I., Shakhov A.N., Murakami T., Drutsкая L.N., Förster I., Clausen B.E., Tessarollo L., Ryffel B., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. **Distinct and nonredundant *in vivo* functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects.** *Immunity*. 2005;22(1):93-104.
- Holdcraft R.W., Braun R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Intern. J. Androl.* 2004;27:335-342.
- McLachlan R.I., Wreford N.G., Meachem S.J., De Kretser D.M., Robertson D.M. **Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat.** *Biol. Reprod.* 1994;51(5):945-955.
- Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. The role of the immune system in behavioural strategies of reproduction. *J. Reprod. Dev.* 2000;46:341-365.
- Pentikäinen V., Erkkilä K., Suomalainen L., Ojala M., Pentikäinen M.O., Parvinen M., Dunkel L. TNF alpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(9):4480-4488
- Perdichizzi A., Nicoletti F., La Vignera S., Barone N., D'Agata R., Vicari E., Calogero A. Effects of tumour necrosis factor- α on human sperm motility and apoptosis. *J. Clin. Immunol.* 2007;27:341-365.
- Pérez C.V., Theas M.S., Jacobo P.V., Jarazo-Dietrich S., Guazzone V.A., Lustig L. Dual role of immune cells in the testis. *Spermatogenesis*. 2013;3(1):e23870. DOI: 10.4161
- Perry G., Cash A.D., Smith M.A. Alzheimer disease and oxidative stress. *J. Biomed. Biotechnol.* 2002;2(3):120-123.
- Prather A.A., Rabinovitz M., Pollock B.G., Lotrich F.E. Cytokine-induced depression during IFN- α treatment: the role of IL-6 and sleep quality. *Brain Behav. Immun.* 2009;23(8):1109-1116. DOI: 10.1016/j.bbi.2009
- Raison C.L., Rye D.B., Woolwine B.J., Vogt G.J., Bautista B.M., Spivey J.R., Miller A.H. Chronic interferon-alpha administration disrupts sleep continuity and depth in patients with hepatitis C: association with fatigue, motor slowing, and increased evening cortisol. *Biol. Psychiatry*. 2010;15(10):942-949. DOI: 10.1016/j.biopsych.2010
- Ramón M., Soler A.J., Ortiz J.A., García-Alvarez O., Maroto-Morales A., Roldan E.R.S., Garde J.J. Sperm population structure and male fertility. *Biol. Reprod.* 2013;7(89):110.
- Riccioli A., Starace D., D'Alessio A., Starace G., Padula F., De Cesaris P., Filippini A., Ziparo E. TNF-alpha and IFN-gamma regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium. *J. Immunol.* 2000;15(165):743-749.
- Suh J.H., Gong E.Y., Hong C.Y., Park E., Ahn R.S., Park K.S., Lee K. Reduced testicular steroidogenesis in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008;112(1/3):117-121.
- Sultan B., May L.A., Lane A. P. The role of TNF- α in inflammatory olfactory loss. *Laryngoscope*. 2011;121(11):2481-2486.
- Suominen J.S., Wang Y., Kaipia A., Toppari J. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promotes cell survival during spermatogenesis, and this effect can be blocked by infliximab, a TNF-alpha antagonist. *Eur. J. Endocrinol.* 2004;151(5):629-640.
- Theas M.S., Rival C., Jarazo-Dietrich S., Jacobo P., Guazzone V.A., Lustig L. Tumour necrosis factor- α released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. *Hum. Reprod.* 2008;23(8):1865-1872.
- Wosnitzer M., Goldstein M., Hardy M.P. **Review of Azoospermia.** *Spermatogenesis*. 2014;31(4):e28218.
- Wride M.A., Sanders E.J. Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat. Embryol. (Berl)*. 1995;191(1):1-10.
- Zalman S.S., Siegel A. **The neurobiology of aggression and rage: role of cytokines.** *Brain Behav. Immun.* 2006;20(6):507-514.

Роль генов *Mucin-2* и *Kaiso* в социальном поведении мышей

Е.Н. Кожевникова¹, К.М. Ачасова¹, В.С. Коростина², Е.Б. Прохорчук², Е.А. Литвинова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Воспалительные процессы в кишечнике приводят к нарушениям различных систем организма, в частности к изменению работы центральной нервной системы. Несмотря на то что механизмы такого влияния пока не известны, показано, что воспаление кишечника ассоциировано с тревожностью и депрессией. В данной работе мы использовали генетическую модель животных, которая связана как с воспалением кишечника, так и с нервной системой. Такой моделью послужили мыши с двойной мутацией в генах *Kaiso* и *Mucin-2*. Ген *Kaiso* кодирует транскрипционный фактор, который экспрессируется как в кишечнике, так и в мозге. А ген *Mucin-2* кодирует белок, который служит основой для синтеза протеогликана кишечной выстилки. *Mucin-2* является основным протеогликаном кишечника и выполняет множество функций, включая барьерную и защитную. Мы протестировали животных с мутацией в гене, кодирующем транскрипционный фактор *Kaiso*, в тестах на социальное поведение, но не обнаружили отличий от контрольных животных. Однако животные с двойной мутацией как в гене *Kaiso*, так и в гене протеогликана кишечника *Mucin-2* показали достоверные отличия в социальном поведении: снижение агрессии и увеличение садок на самца-интродера. Эти результаты говорят о том, что гомеостаз кишечной выстилки может иметь влияние на работу центральной нервной системы животного. На данный момент остается неизвестным, является ли влияние двух генов на поведение мышей синергическим или вклад в поведение животных дает только мутация в гене *Mucin-2*. Дальнейшие исследования помогут ответить на этот вопрос.

Ключевые слова: мыши; социальное поведение; кишечное воспаление; муцин-2.

Role of the *Mucin-2* and *Kaiso* genes in the social behavior of mice

E.N. Kozhevnikova¹, K.M. Achasova¹, V.S. Korostina², E.B. Prokhortchouk², E.A. Litvinova¹

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

² Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Inflammatory processes in the gut lead to abnormalities in various systems of the body, in particular, to changes in the activity of the central nervous system. Although the mechanisms of these effects are not yet known, it has been demonstrated that intestinal inflammation is associated with anxiety and depression. In this work, we used an animal model of intestinal inflammation, which might result in behavioral changes. The animals used were knock-out mice with double mutations in the *Kaiso* and *Mucin-2* genes. The *Kaiso* gene encodes a transcription factor that is expressed both in the brain and in the intestine. The *Mucin-2* gene encodes a protein that serves as a scaffold for the synthesis of intestinal proteoglycan. *Mucin-2* is a major proteoglycan of the intestinal mucus layer and performs multiple functions, including barrier and defensive ones. We used knock-out animals with a mutation in the transcription factor *Kaiso* in tests assessing social behavior, but did not observe any difference between test subjects and wild-type animals. By contrast, double knock-out animals that additionally had a mutation in *Mucin-2*, a major gene for intestinal proteoglycan, displayed significant changes in social behavior: lower aggression rates and higher rates of courtship behavior toward a male intruder. These results suggest that intestinal homeostasis might have a strong impact on the nervous system of the animals. It remains unclear whether the influence of the two genes is synergistic or the knock-out of the *Mucin-2* gene alone determines this behavior in mice. Further investigations will help clarify the matter.

Key words: mice; social behavior; intestine inflammation; Mucin-2.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Кожевникова Е.Н., Ачасова К.М., Коростина В.С., Прохорчук Е.Б., Литвинова Е.А. Роль генов *Mucin-2* и *Kaiso* в социальном поведении мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):410-412. DOI 10.18699/VJ15.053

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Kozhevnikova E.N., Achasova K.M., Korostina V.S., Prokhortchouk E.B., Litvinova E.A. The role of the *Mucin-2* and *Kaiso* genes in the social behavior of mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):410-412. DOI 10.18699/VJ15.053

DOI 10.18699/VJ15.053

УДК 575.167

Поступила в редакцию 03.07.2015 г.

Принята к публикации 21.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

Известно, что воспалительные процессы в кишечнике приводят к образованию злокачественных опухолей и изменению состава симбиотической микрофлоры (Arthur et al., 2012). Такие воспалительные реакции могут быть вызваны инфицированием патогенными микроорганизмами, изменениями иммунного статуса, химическим отравлением. Также известны некоторые гены, мутации в которых приводят к воспалению кишечника. Одним из них является ген *Mucin-2* (*Muc2*), который кодирует основной протеогликан кишечного мукозального слоя. Муцин-2 формирует физический барьер между бактериальной микрофлорой и энтероцитами, защищая ткани кишечника от возможного прямого контакта с патогенными микроорганизмами (Bergstrom et al., 2010). У животных с мутацией в гене *Muc2* развиваются злокачественные новообразования кишечника, и эта линия мышей служит экспериментальной моделью для изучения воспаления и канцерогенеза (Velcich et al., 2002). В недавних исследованиях было показано, что в опухолях у животных с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2^{-/-}*) значительно повышается экспрессия транскрипционного фактора Kaiso (Daniel, Reynolds, 1999), а животные с мутацией в этом гене (*Kaiso^{-/-}*) демонстрируют устойчивость к развитию рака кишечника (Prokhorchouk et al., 2006). Белок Kaiso содержит домен «цинковые пальцы» и является транскрипционным фактором, который подавляет активность генов (Prokhorchouk et al., 2001; Lopes et al., 2008). Поскольку Kaiso инактивирует гены опухолевых супрессоров, то комбинация мутаций в генах *Muc2* и *Kaiso* может подавлять развитие злокачественных опухолей в кишечнике.

Материалы и методы

Работа выполнена в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на самцах мышей инбредной линии C57BL/6J в возрасте 8–12 нед и самцах инбредной линии Balb/cJ в возрасте 18 дн. (ювенильные интродеры). В ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН животные C57BL/6J и Balb/cJ поступили в 2013 г. из Jackson Laboratory (США). Животных *Kaiso^{-/-}* и *Muc2^{-/-};Kaiso^{-/-}* на генетическом фоне C57BL/6J получили из лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных (Институт биоинженерии, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва). В ходе теста взрослые самцы были рассажены по одному в индивидуально вентилируемых клетках (Optimice, США) за три дня до начала теста при искусственном световом режиме 14С : 10Т; корм и питье предоставляли *ad libitum*. Работу с животными проводили согласно биоэтическим нормам Директивы Евросоюза (ECC Directive 86/609/EEC). Протокол эксперимента утвержден комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Разрешение выдано 14.10.2013, № 18.4).

Для определения особенностей социального поведения животных был использован тест с ювенильным интродером. В день эксперимента в темное время суток к тестируемому самцам в клетки были посажены молодые (18 дн.) самцы линии Balb/cJ на 2 мин. Через 90 мин эти же животные были посажены снова на 5 мин. Во время второго предоставления регистрировали социальную активность животных-резидентов.

Для определения уровня гормонов в фекалиях животных использовался метод непрямого иммуоферментного анализа (ИФА). Пробы фекалий собирали из клеток самцов, высушивали при комнатной температуре до постоянного объема, перетирали и гомогенизировали в воде. Затем центрифугировали, 200 мкл надосадочной жидкости использовали для ИФА. Для определения количества кортикостерона использовали набор Corticosterone ELISA Kit (Enzo Lifescience, Германия), а для определения количества тестостерона – набор Тестостерон-ИФА (ХЕМА, Россия). Концентрации гормонов выражали в нг/мг.

Результаты и обсуждение

В данной работе мы исследовали влияние генов *Kaiso* и *Muc2* на социальное поведение животных. Поскольку Kaiso является транскрипционным фактором, который экспрессируется в различных тканях мыши (Shumskaya et al., 2015) и влияет на активность и обучаемость у животных (Kulikov et al. Материал готовится к печати), то он также может влиять и на социальное взаимодействие у мышей. Мы протестировали самцов дикого типа и мутантных животных (*Kaiso^{Y/-}* и *Muc2^{-/-};Kaiso^{Y/-}*) в эксперименте на социальное взаимодействие с ювенильным интродером. Наши эксперименты показали, что у животных с мутацией в гене *Kaiso* не наблюдалось достоверных отличий в поведении от животных контрольной группы. К нашему удивлению, у животных с двойной мутацией (*Muc2^{-/-};Kaiso^{Y/-}*) наблюдались достоверные отличия по количеству садок и актов агрессии от животных дикого типа и *Kaiso^{-/-}*. Животные *Muc2^{-/-};Kaiso^{Y/-}* демонстрировали увеличение количества садок на самца и уменьшение числа актов агрессии, показывая в целом менее агрессивное поведение по отношению к интродеру (рис. 1). Таким образом, мы видим, что двойная мутация генов *Kaiso* и *Muc2* приводит к достоверному изменению социальной реакции на ювенильного интродера.

Отсутствие Mucin-2 приводит к сильному воспалению (Bergstrom et al., 2010), что, в свою очередь, может вызвать изменение уровня гормонов в крови животных. Таким образом, различия в социальном поведении могли бы быть объяснены изменением уровня тестостерона и кортикостерона (Goujon et al., 1995). Для того чтобы понять, связано ли изменение социальной реакции на ювенильного интродера с изменением уровня гормонов у животных *Muc2^{-/-};Kaiso^{Y/-}*, мы измерили уровень тестостерона и кортикостерона в фекалиях трех групп животных. Измерения показали отсутствие достоверных различий между группами (рис. 2). Таким образом, изменение поведения у животных с двойной мутацией в генах *Kaiso* и *Muc2* не объясняется изменением гормонального фона самцов.

Белковый продукт гена *Muc2* экспрессируется в тканях кишечника, и его основной функцией является формирование мукозального барьера для патогенных микроорганизмов. Мы предполагаем, что изменения в поведении животных связаны с хроническим воспалением кишечника, вызванным отсутствием муцина. В пользу этого предположения говорит то, что у животных с нокаутом некоторых генов интерлейкинов развивается обширное воспаление кишечника (Scheinin et al., 2003), а у мутантов по интерлейкину 1 наблюдаются отклонения

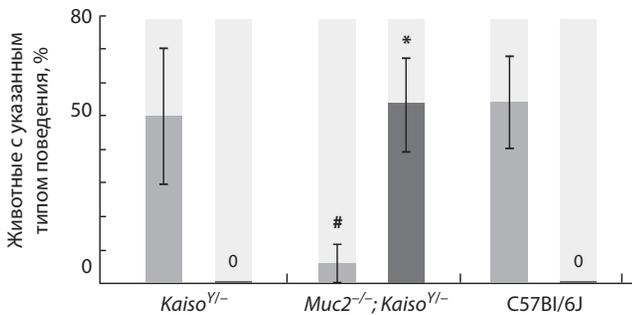


Рис. 1. Мутация в гене *Muc2* вызывает изменения в социальном поведении самцов.

Садка (черный), агрессия (белый); $n(\text{C57Bl/6J}) = 7$, $n(\text{Kaiso}^{Y/Y-}) = 6$, $n(\text{Muc2}^{-/-}; \text{Kaiso}^{Y/Y-}) = 17$. # – между *Muc2*^{-/-}; *Kaiso*^{Y/Y-} и диким типом: $p < 0,05$, $\chi^2 = 5,45$; * – между *Muc2*^{-/-}; *Kaiso*^{Y/Y-} и диким типом: $p < 0,05$, $\chi^2 = 4,94$.

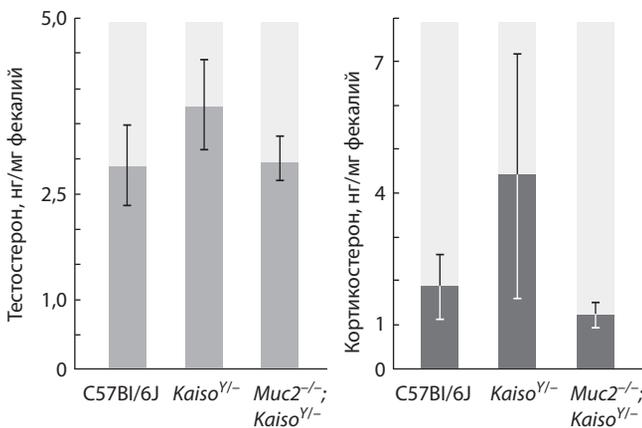


Рис. 2. У животных линий *Muc2*^{-/-}; *Kaiso*^{Y/Y-}, *Kaiso*^{Y/Y-} и C57Bl/6J не наблюдается различий в уровне тестостерона и кортикостерона.

в поведении (Moshkin et al., 2001). Кишечное воспаление и изменение уровня интерлейкинов могут также приводить к изменениям поведения в случае мутации в гене *Muc2*. С другой стороны, муцин-2 является ключевым компонентом среды для размножения симбиотических бактерий в полости кишечника, состав которых тоже может оказывать влияние на поведение животных (Clarke et al., 2013). Таким образом, эффект мутации в гене *Muc2* на функцию нервной системы может быть опосредован как изменением состояния иммунитета, так и сдвигом в составе микрофлоры кишечника, вызванным воспалением и отсутствием муцина. В дальнейшем необходимо проверить, является ли изменение социальной реакции на ювенильного интродера животных *Muc2*^{-/-}; *Kaiso*^{Y/Y-} следствием синергического влияния двух генов или зависит исключительно от мутации в гене *Muc2*. Более того, наши данные говорят о том, что животные *Muc2*^{-/-} требуют более тщательного изучения в других поведенческих тестах. И наконец, необходимы функциональные эксперименты, для того чтобы объяснить механизмы взаимосвязи *Muc2* и работы центральной нервной системы. Данная работа является отправной точкой в изучении роли мукозального барьера в регуляции поведения животных.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-32059.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Arthur J.C., Perez-Chanona E., Muhlbauer M., Tomkovich S., Uronis J.M., Fan T.J., Campbell B.J., Abujamel T., Dogan B., Rogers A.B., Rhodes J.M., Stintzi A., Simpson K.W., Hansen J.J., Keku T.O., Fodor A.A., Jobin C. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 2012;338:120-123. DOI: 10.1126/science.1224820
- Bergstrom K.S., Kisooson-Singh V., Gibson D.L., Ma C., Montero M., Sham H.P., Ryz N., Huang T., Velcich A., Finlay B.B., Chadee K., Vallance B.A. Muc2 protects against lethal infectious colitis by dissociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000902. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000902
- Clarke G., Grenham S., Scully P., Fitzgerald P., Moloney R.D., Shanahan F., Dinan T.G., Cryan J.F. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatr.* 2013;18:666-673. DOI: 10.1038/mp.2012.77
- Daniel J.M., Reynolds A.B. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 1999;19:3614-3623.
- Goujon E., Parnet P., Aubert A., Goodall G., Dantzer R. Corticosterone regulates behavioral effects of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta in mice. *Am. J. Physiol.* 1995;269:R154-R159.
- Lopes E.C., Valls E., Figueroa M.E., Mazur A., Meng F.G., Chiosis G., Laird P.W., Schreiber-Agus N., Grealley J.M., Prokhortchouk E., Melnick A. Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Res.* 2008;68:7258-7263. DOI: 10.1158/0008-5472
- Moshkin M.P., Tamagawa A., Kolosova I.E., Gerlinskaya L.A., Iwakura Y., Endo Y. Behavioral and endocrine effects of endotoxin in wild-type mice and mice deficient in interleukin 1: sickness behavior or adaptive response. *Dokl. Biol. Sci.* 2001;379:322-324.
- Prokhortchouk A., Hendrich B., Jorgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes. Dev.* 2001;15:1613-1618.
- 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.
- Scheinin T., Butler D.M., Salway F., Scallan B., Feldmann M. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2003;133:38-43.
- Shumskaya V.S., Zhigalova N.A., Prokhorchouk A.V., Prokhorchouk E.B. Distribution of Kaiso protein in mouse tissues. *Histochem. Cell Biol.* 2015;143:29-43. DOI 10.1007/s00418-014-1261-7
- Velcich A., Yang W., Heyer J., Fragale A., Nicholas C., Viani S., Kucherlapati R., Lipkin M., Yang K., Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin *Muc2*. *Science*. 2002;295:1726-1729.

Использование модели половой активации для фенотипирования самцов линий мышей и крыс с закрепленными селекцией нарушениями поведения

М.А. Тихонова, Т.Г. Амстиславская

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины», Новосибирск, Россия

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

Половое поведение относится к числу биологически высокозначимых форм поведения. Особый интерес вызывает начальный этап, половое возбуждение, поскольку именно оно запускает весь комплекс событий и остается наименее изученным элементом данного поведения. Половые дисфункции возникают вследствие возрастной инволюции, стрессорных воздействий, побочного действия психотропных веществ, являются симптомами различных неврологических и психических расстройств. При моделировании и изучении различных патологий на животных и эффектов психотропных средств исследование полового поведения представляется актуальным и важным этапом. В данной работе с помощью оригинальной, разработанной ранее модели половой активации самцов было проведено фенотипирование животных с наследственно обусловленной предрасположенностью к катаlepsии и изучена взаимосвязь катаlepsии с выраженностью половой активации. Показана взаимосвязь главного гена предрасположенности к катаlepsии с выраженностью половой мотивации, но не гормональной составляющей полового возбуждения (повышением уровня тестостерона в плазме крови при предъявлении рецептивной самки). У мышей линии ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy), предложенных как модель депрессии, выявлено снижение уровня половой мотивации, в то время как у крыс линии ГК (генетическая катаlepsия), в которой на данном этапе селекции преобладают высоковозбудимые животные, соответствующие по проявлениям маниакальному полюсу биполярных расстройств, наблюдается повышение выраженности половой мотивации. Результаты исследования хорошо согласуются с клиническими данными о снижении либидо у больных депрессией и гиперсексуальности пациентов с биполярным расстройством.

Ключевые слова: мужское половое поведение; мышь; крыса; половая активация; половая мотивация; тестостерон; катаlepsия; селекционные модели психопатологии; аффективные расстройства.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Тихонова М.А., Амстиславская Т.Г. Использование модели половой активации для фенотипирования самцов линий мышей и крыс с закрепленными селекцией нарушениями поведения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):413-419. DOI 10.18699/VJ15.054

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Tikhonova M.A., Amstislavskaya T.G. Phenotyping the males of mouse and rat strains with genetically defined behavioral disturbances in a model of sexual activation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):413-419. DOI 10.18699/VJ15.054

DOI 10.18699/VJ15.054

УДК 575.21:591.551

Поступила в редакцию 02.07.2015 г.

Принята к публикации 22.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: mar-a-tikh@mail.ru; mar_tikh@bionet.nsc.ru; amst@bionet.nsc.ru

Phenotyping the males of mouse and rat strains with genetically defined behavioral disturbances in a model of sexual activation

M.A. Tikhonova, T.G. Amstislavskaya

Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine, Novosibirsk, Russia
Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Sexual behavior is one of the biologically highly relevant types of behavior. Sexual arousal, or an initial stage of sexual behavior, is of particular interest since it triggers all the following events but still remains the least known element of this behavior. Sexual dysfunctions are caused by aging, stress, or side effects of psychotropic drugs; they are symptoms of a variety of neurological and psychiatric disorders. Therefore, the study of sexual behavior appears to be an important step in modeling various animal pathologies and the effects of psychotropic drugs. We have performed phenotyping of animals with hereditary predisposition to catalepsy using our previous development, a model of male sexual arousal, and examined the relationship between catalepsy and sexual arousal. The main gene for a high predisposition to catalepsy was shown to be associated with the expression of sexual motivation, but not with the hormonal component of sexual arousal (increase in plasma testosterone levels following exposure to a receptive female). ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) mice, proposed as a model of depression, had a decreased manifestation of sexual motivation, while male GC (Genetic Catalepsy) strain rats had enhanced sexual motivation. Noteworthy, highly excitable GC strain animals corresponding to the manic pole of bipolar disorders prevail at the current stage of breeding. Our results are in a good agreement with clinical data that indicate reduced libido in depressed patients and hypersexuality in people with bipolar disorder.

Key words: male sexual behavior; mouse; rat; sexual activation; sexual motivation; testosterone; catalepsy; selective models of psychopathology; affective disorders.

Половое поведение относится к числу биологически высокозначимых форм поведения, является составной частью процесса размножения и представляет собой определенную последовательность поведенческих актов. Большинство исследователей разделяют половое поведение на appetentную и consumatorную фазы. Appetentное поведение – это подготовительное, поисковое, оно позволяет животному достичь контакта с объектом цели; consumatorное поведение имеет место уже при контакте со стимулом (Pfaus, 1999). Самцы крыс и мышей в appetentной фазе могут демонстрировать следующие формы поведения: бесконтактная (психогенная) половая активация, преследование самки, аногенитальное обнюхивание и т. д. Особый интерес вызывает начальный этап, половое возбуждение, поскольку именно оно запускает весь комплекс событий в развитии полового поведения. В то же время половая мотивация остается наименее изученным элементом данного поведения (Амстиславская, Осипов, 2003).

Половые дисфункции у мужчин классифицируют в зависимости от их проявления в цикле сексуального реагирования (нарушения либидо, возбуждения (эректильная дисфункция), оргазма (преждевременные или задержки эякуляции; аноргазмия)) (Rösing et al., 2009). Термин «половая дисфункция» описывает нарушения сексуального желаяния и психологических, эндокринных, сосудистых и неврологических параметров, присущих нормальному половому поведению (Baldwin, 2004). Возможные причины половых дисфункций многообразны: возрастная инволюция, депрессия, тревожные состояния, стресс, неврологические расстройства (поражения головного и спинного мозга, повреждения срамного нерва), а также эндокринные и соматические заболевания (гипогонадизм, гиперпролактинемия, гипер- и гипотиреоз, болезнь Аддисона, атеросклероз, артериальная гипертензия), побочное действие нейротропных, гиполипидемических и антигипертензивных, мочегонных, нейро- и психотропных препаратов (Rösing et al., 2009). Таким образом, при моделировании и изучении различных патологий на животных и эффектов психотропных средств исследование полового поведения представляется актуальным и важным этапом.

Ранее нами была предложена и валидирована модель для изучения процессов половой активации самцов мышей и крыс (Amstislavskaya, Popova, 2004). В условиях, исключающих контакт между животными (рецептивная самка отделена от самца прозрачной перфорированной перегородкой), оцениваются выраженность половой мотивации по поведению самцов в течение 10 мин, а также гормональной активации, которую можно определить по подъему уровня тестостерона в плазме крови, происходящему у большинства изученных линий мышей и крыс на 20–40-й мин предъявления рецептивной самки. Время пребывания самца у перегородки, когда он перемещается вдоль нее, обнюхивает ее, встает на задние лапы, касаясь перегородки двумя лапами или одной передней, всовывает нос в отверстие или грызет их края в попытках преодолеть перегородку и проникнуть к самке, служит основной поведенческой характеристикой половой мотивации,

а число подходов к перегородке отражает в большей степени двигательную активность и общее возбуждение животного (Amstislavskaya, Popova, 2004). Следует отметить, что параллели этим процессам были обнаружены у мужчин (Roney et al., 2007). С использованием модели половой активации нами были изучены возрастные аспекты угасания половой мотивации при естественном и ускоренном старении на линиях крыс Вистар и OXYS, различающихся темпом старения (Белоусова и др., 2009; Амстиславская и др., 2010; Amstislavskaya et al., 2010; Tikhonova et al., 2014).

Было выявлено, что линия крыс ГК (генетическая каталепсия), созданная в ИЦиГ СО РАН г. Новосибирска в ходе многолетней селекции на предрасположенность к одному из видов пассивно-оборонительного поведения, каталепсии, характеризуется рядом депрессивно-подобных черт, что позволило предложить ее как удобную и адекватную модель для изучения механизмов действия антидепрессантов и развития депрессии (Колпаков и др., 2004; Kulikov et al., 2006). Каталепсия, или реакция замирания, представляет собой обратимое непровольное обездвиживание с пластическим мышечным тонусом и у лабораторных животных определяется как невозможность скорректировать внешне приданную позу (Sanberg et al., 1988). У человека каталепсия утратила свой изначальный оборонительный смысл, в чрезмерно выраженной форме она сохранилась как симптом ряда психических и нервных заболеваний, таких как шизофрения и депрессия.

Для дальнейшего изучения генетической структуры предрасположенности к каталепсии и ее взаимосвязи с депрессивно-подобным состоянием под руководством доктора биологических наук А.В. Куликова в ИЦиГ СО РАН на другом виде лабораторных грызунов, мышах, были созданы линии ASC/Icg и AKR.CBA-D13Mit76. Линия мышей ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) была получена путем селекции на высокую предрасположенность к каталепсии из популяции бэккроссов между мышами некаталептической линии AKR/J и каталептической линии CBA/LacJ (Kulikov et al., 2008). Как и крысы линии ГК, мыши линии ASC обладают рядом признаков депрессивно-подобного состояния (Базовкина и др., 2005). Более того, с помощью микросателлитного картирования была установлена генетическая структура предрасположенности к каталепсии, которая включает в себя один главный ген и ряд генов-модификаторов, и определена локализация главного гена каталепсии в дистальном фрагменте хромосомы 13 (61–70 cM) (Kulikov et al., 2008). Этот фрагмент был перенесен от линии CBA на геном линии AKR, и была получена конгенная линия AKR.CBA-D13Mit76.

Известно, что у большинства пациентов с депрессией наблюдаются те или иные половые расстройства, и потеря либидо – одно из характерных проявлений депрессивных расстройств (Clayton, Montejo, 2006). В то же время взаимосвязь каталепсии с половыми дисфункциями не ясна. Целью настоящей работы было изучение проявлений половой активации у животных с высокой генетической предрасположенностью к каталепсии.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты были проведены на половозрелых самцах мышей инбредных линий АКР/J и СВА/LacJ, а также селекционированных в ИЦиГ СО РАН линий ASC/Icg и АКР.СВА-D13Mit76; половозрелых самцах крыс аутбредной линии Вистар и селекционированной в ИЦиГ СО РАН линии ГК. Тестирование животных проводили в возрасте 4,5–5 мес.

Животных содержали при естественном освещении и стандартных условиях (при температуре 18–22 °С и относительной влажности 50–60 %) в виварии ИЦиГ СО РАН. Полноценный корм и воду они получали без ограничения. Содержание животных и экспериментальные процедуры соответствовали правилам NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Были приложены все усилия для минимизации числа животных и их страданий.

Модель исследования половой активации самцов мышей и крыс. Перед началом опыта самцов мышей рассаживали по одному в металлические клетки размером 29 × 15 × 10 см, разделенные пополам прозрачной перегородкой с небольшими отверстиями, на 3 дня для снятия групповых эффектов и адаптации к новым условиям. Тестирование в рамках модели «половая активация» проводили между 14:00 и 17:00 местного времени. За 5 мин до тестирования металлические крышки экспериментальных клеток менялись на прозрачный пластик, что было необходимо для наблюдения за животными. Далее в течение 10 мин тестировалась спонтанная активность самца на пустой отсек. Затем в соседний отсек помещали рецептивную самку и в течение 10 мин регистрировали число и время подходов самца к перегородке (Amstislavskaya, Porova, 2004; Тихонова и др., 2010).

Исследование полового мотивационного поведения самцов крыс проводили в вечернее время с 19:00 до 21:00 при красном свете в стандартной пластиковой клетке (52 × 33 × 20), разделенной на два отсека прозрачной перфорированной перегородкой, через которую могут происходить обонятельные и визуальные контакты между животными. Перед тестированием каждого самца изолировали в такой клетке на трое суток для снятия группового эффекта. Непосредственно перед тестированием клетку с самцом переносили в соседнее помещение и после 5 мин адаптации к новым условиям в течение следующих 10 мин оценивали спонтанную активность самца около перегородки. Затем в соседний отсек помещали рецептивную самку и в течение 10 мин регистрировали время активного исследования самцом перегородки и количество подходов к ней (Amstislavskaya, Porova, 2004).

При тестировании самцов мышей использовали овариэктомированных самок мышей (беспородных и линии СВА) с гормонально вызванным эструсом. Всем группам самцов предъявляли одинаковое количество беспородных и линейных самок. При тестировании самцов крыс использовали овариэктомированных самок крыс линии Вистар с гормонально вызванным эструсом. Кастрацию самок производили согласно общепринятой методике под общим наркозом (avertin, 2,5 %-й р-р). В эксперимент самки допускались не ранее чем через 3 недели после операции и при условии, что у них не наблюдалось воспалительных процессов и возобновления циклических

изменений в матке и влагалище, которые определялись по исследованию вагинального мазка.

Для стимуляции эструса самкам мышей за 48 ч до тестирования подкожно вводили масляный раствор β-эстрадиола («Sigma», США) (40 мкг/животное), за 24 ч повторно вводили β-эстрадиол (20 мкг/животное), а за 2–4 ч до тестирования – масляный раствор прогестерона («Дальхимфарм», Хабаровск, Россия) (500 мкг/животное). Эструс у овариэктомированных самок крыс вызывали последовательным подкожным введением за 48 ч до тестирования масляного раствора эстрадиола (100 мкг/животное) и за 4 ч до тестирования – прогестерона (750 мкг/животное). Объем вводимой жидкости составлял 0,2 мл/животное. Рецептивность самок подтверждали вагинальным мазком и выраженностью лордозной реакции в день теста.

Тестирование социального интереса. Для разграничения полового мотивационного поведения и социального интереса наряду с сексуально значимым стимулом (рецептивной самкой) в экспериментальных сериях использовали социальный стимул (овариэктомированную самку). Исследование социального поведения по отношению к овариэктомированной самке также проводилось в тесте с перегородкой. В других сериях был проведен отдельный тест социального взаимодействия с ювенильным самцом. В этом случае в клетку экспериментального самца подсаживали ювенильного беспородного самца (возраст 3–4 нед). Использование при тестировании ювенильного интродера позволяет минимизировать агрессивную компоненту взаимодействия и предоставить тестируемому самцу стимулы социального характера. Социальное взаимодействие включает: обнюхивание головы, тела, гениталий и хвоста партнера, груминг и следование. Регистрировали продолжительность социальных контактов. Время теста – 10 мин (Henry et al., 2008; Тихонова и др., 2010).

Определение уровня тестостерона в плазме крови. Для оценки гормональной составляющей половой активации проводили забор крови для измерения уровня тестостерона, который осуществляли в обычных условиях (базальный уровень) и на фоне половой активации. Самцов мышей через 20 мин после предъявления рецептивной самки в соседнем отсеке декапитировали и собирали кровь. Для определения исходного уровня гормона брали интактных самцов мышей, находившихся в тех же экспериментальных условиях, но без предъявления рецептивной самки. У самцов крыс образцы крови брали из хвоста, обрезая 3–4 мм его кончика под легким (1 мин) эфирным наркозом, через 20 мин после предъявления в соседний отсек самки (т.е. после 35 мин суммарной экспозиции при красном свете). Для определения исходного уровня гормона, предшествующего половой активации, кровь брали из хвоста через 35 мин после пребывания самца при красном освещении в тестовых условиях (Amstislavskaya, Porova, 2004).

Кровь брали в пробирку, обработанную гепарином, центрифугировали 9 мин со скоростью 4000 об./мин, отбирали плазму и хранили ее при –20 °С. Уровень тестостерона определяли набором ИФА («Хема-Медика», Москва, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные выражали как $M \pm m$ и сравнивали с помощью

одно- или двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). В качестве независимых факторов в двухфакторном анализе различий по уровням тестостерона были взяты эффекты генотипа линий («генотип») и условий половой активации («активация»). Для анализа данных по параметрам поведенческой составляющей половой активации использовали двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (Repeated Measures ANOVA). Различия между отдельными группами оценивали с помощью *post-hoc*-сравнений с применением теста LSD Fisher.

Результаты

Мы изучили выраженность половой активации у самцов мышей, характеризующихся генетически обусловленной предрасположенностью или резистентностью к каталепсии. Показано достоверное влияние факторов «генотип» ($F(3,34) = 8,2, p < 0,001$), «предъявление рецептивной самки» ($F(1,34) = 83,2, p < 0,001$) и их взаимодействия ($F(3,34) = 6,5, p < 0,01$) на основной показатель выраженности половой мотивации, время у перегородки (рис. 1, а). У самцов мышей родительской некаталептической линии AKR/J выраженность половой мотивации была значительно ниже, чем у самцов мышей родительской каталептической линии CBA/Lac. У мышей линии ASC значение этого параметра было промежуточным. У мышей конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76 уровень половой мотивации был выше, чем у AKR, и ниже, чем у CBA (рис. 1, а).

Выявлено достоверное влияние факторов «генотип» ($F(3,34) = 9,9, p < 0,001$), «предъявление рецептивной самки» ($F(1,34) = 25,7, p < 0,001$), но не их взаимодействия ($F(3,34) = 2,5, p > 0,05$) на число подходов самца к перегородке, которое отражает двигательную активность и общее возбуждение животного (рис. 1, б). Обнаружено достоверное влияние фактора «предъявление рецептивной самки» ($F(1,72) = 15,42, p < 0,001$), но не «генотип» ($F(3,72) = 2,4, p > 0,05$) или взаимодействия факторов ($F(3,72) < 1$) на уровень тестостерона в плазме крови самцов мышей (рис. 1, в). Достоверное повышение уровня тестостерона в условиях половой активации наблюдалось только у самцов мышей линии CBA ($p < 0,05$ по сравнению с базальным уровнем), что свидетельствует об изменении в гормональной регуляции полового поведения у самцов мышей других исследованных линий.

В то же время достоверного влияния фактора «генотип» ($F(3,33) = 2,2, p > 0,05$) на показатель социального интереса, время социального взаимодействия с ювенильным самцом обнаружено не было. Время взаимодействия составило $204,3 \pm 16,1$, $188,1 \pm 26,9$, $120,8 \pm 25,1$ и $175,0 \pm 32,8$ с для мышей линий CBA/Lac, ASC, AKR.CBA-D13Mit76 и AKR/J соответственно. Это указывает на специфичность выявленных различий, связанных с реакцией на сексуальный стимул, в модели половой активации.

Показатели половой активации у крыс линии ГК, другой модели генетической предрасположенности к каталепсии, также отличались от контроля, крыс линии Вистар. Было обнаружено достоверное влияние факторов «генотип» ($F(1,36) = 33,8, p < 0,001$), «предъявление партнера» ($F(2,36) = 90,8, p < 0,001$) и их взаимодействия ($F(2,36) = 13,2, p < 0,001$) на основной показатель вы-

раженности половой мотивации, время у перегородки (рис. 2, а). У самцов некаталептической контрольной линии Вистар время у перегородки, за которой находилась рецептивная самка, было достоверно выше, чем при спонтанной активности на пустой отсек ($p < 0,001$), а также при предъявлении за перегородкой социального стимула, нерцептивной кастрированной самки ($p < 0,01$). В то же время показатели половой мотивации и социального интереса у крыс линии ГК были повышены по сравнению с крысами Вистар: время, проведенное у перегородки при предъявлении и рецептивной, и нерцептивной самок, было достоверно выше у крыс ГК, чем у соответствующих групп самцов Вистар ($p < 0,001$). У крыс ГК также были выявлены различия в реакции на социальный и сексуальный стимулы ($p < 0,05$).

Аномальная реакция крыс ГК на социальный стимул была подтверждена и в тесте на социальное взаимодействие. Показано достоверное влияние фактора «генотип» ($F(1,16) = 5,5, p < 0,05$) на время социального взаимодействия с ювенильным самцом. Время взаимодействия составило $171,0 \pm 27,8$ и $247,3 \pm 20,0$ с для крыс линий Вистар и ГК соответственно.

Продемонстрировано достоверное влияние факторов «генотип» ($F(1,36) = 12,6, p < 0,01$), «предъявление партнера» ($F(2,36) = 35,9, p < 0,001$), но не их взаимодействия ($F(2,36) = 1,9, p > 0,05$) на число подходов самцов крыс к перегородке (рис. 2, б). Показатели самцов ГК при предъявлении и сексуального, и социального стимулов были достоверно выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$), но не различались между собой ($p > 0,05$).

Обнаружено достоверное влияние фактора «предъявление партнера» ($F(2,36) = 3,49, p < 0,05$), но не «генотип» ($F(1,36) < 1$) или взаимодействия факторов ($F(3,36) < 1$) на уровень тестостерона в плазме крови самцов крыс (рис. 2, в). Достоверное повышение уровня тестостерона наблюдалось только у самцов Вистар при предъявлении сексуального, но не социального стимула ($p < 0,05$ по сравнению с базальным уровнем), в то время как у крыс ГК достоверных различий между группами не выявлено, хотя и имеется тенденция к повышению уровня тестостерона при предъявлении рецептивной самки ($p = 0,07$).

Обсуждение

Выраженность половой мотивации у мышей родительской некаталептической линии AKR была значительно ниже, чем у мышей родительской каталептической линии CBA, а у мышей ASC и AKR.CBA-D13Mit76 значение этого параметра было промежуточным. Таким образом, аллельный вариант фрагмента хромосомы 13 линии CBA, где расположен главный ген высокой предрасположенности к каталепсии, связан с высоким уровнем половой мотивации, в то время как гены-модификаторы из генома линии AKR обуславливают его снижение у мышей линий ASC и AKR.CBA-D13Mit76. Между родительскими линиями AKR и CBA, а также линиями ASC и AKR.CBA-D13Mit76 не было обнаружено генетического разнообразия по выраженности социального поведения. Это свидетельствует в пользу того, что наблюдаемая разница в выраженности половой мотивации обусловлена именно различием в проявлении сексуального, а не социального интереса.

мотивации. Основным показателем половой мотивации самцов – время, проведенное у перегородки, отделяющей его от рецептивной самки. Самцы ГК провели достоверно больше времени у загородки по сравнению с самцами контрольной «нормальной» родительской линии Вистар. Реакция на социального партнера (кастрированную самку) также была более значимой у самцов крыс ГК, чем у самцов Вистар. В тесте на социальный интерес крысы ГК также характеризовались увеличением времени взаимодействия с социальным партнером (ювенильным самцом) по сравнению с крысами Вистар. Таким образом, как крысы линии ГК, так и мыши линии ASC характеризуются нарушениями половой мотивации, однако в рамках этой модели они носят другой характер (повышение выраженности половой мотивации и социального интереса). Это может быть связано с тем, что на настоящем этапе селекции в популяции крыс ГК преобладают гиперкинетические высоковозбудимые животные, поведение которых сходно с симптомами маниакального полюса биполярных расстройств, а процент животных, проявляющих каталепсию, значительно снизился (Алехина и др., 2006; Рязанова и др., 2012). Следует отметить, что гиперсексуальность является характерной чертой биполярного расстройства (Adelson, 2010).

Реакция повышения уровня тестостерона на самку представляет собой гормональный ответ на половой стимул. Уровень тестостерона в плазме крови в значительной степени зависит от интенсивности его секреции клетками Лейдига семенников, гормональная активность которых наследственно обусловлена. Ранее в таких же модельных условиях при отсутствии непосредственного контакта между самцом и самкой было показано, что эндокринный ответ семенников самцов мышей на сексуальный стимул зависит от генотипа особи и обусловлен иными механизмами, чем те, которые регулируют поведение при половой мотивации (Амстиславская, Храпова, 2002). Нам не удалось выявить взаимосвязь между предрасположенностью к каталепсии и уровнем тестостерона в плазме крови как в условиях покоя, так и на фоне половой активации. Достоверное повышение в ответ на предъявление рецептивной самки было зафиксировано у животных как с предрасположенностью к каталепсии (мыши линии СВА), так и без нее (крысы линии Вистар). В то же время у крыс линии ГК наблюдалась тенденция к повышению уровня тестостерона при предъявлении сексуального стимула, что указывает, по-видимому, на смещение пика подъема уровня гормона по времени по сравнению с крысами Вистар.

В заключение с помощью оригинальной модели половой активации самцов было проведено фенотипирование животных с наследственно обусловленной предрасположенностью к каталепсии и изучена взаимосвязь каталепсии с выраженностью половой активации. Показана взаимосвязь главного гена предрасположенности к каталепсии с выраженностью половой мотивации, но не гормональной составляющей полового возбуждения. У мышей линии ASC, предложенной как модель депрессии, выявлено снижение уровня половой мотивации, в то время как у крыс линии ГК, в которой на данном этапе селекции преобладают высоковозбудимые животные, поведение

которых по проявлениям соответствует маниакальному полюсу биполярных расстройств, наблюдается повышение выраженности половой мотивации, что соотносится с клиническими данными о гиперсексуальности при биполярных расстройствах.

Благодарности

Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных (ЦГР) ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010), частично поддержана бюджетным проектом VI.53.2.4 ИЦиГ СО РАН. Авторы выражают благодарность сотрудникам ИЦиГ СО РАН д.б.н. А.В. Куликову и к.б.н. Т.А. Алехиной за сотрудничество и предоставление животных уникальных линий для экспериментов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Алехина Т.А., Петрова Г.В., Барыкина Н.Н., Прокудина О.И., Чугуй В.Ф., Сахаров Д.Г., Колпаков В.Г. Изменения нейроэндокринологической системы у крыс каталептической линии ГК. Влияние онтогенеза и числа поколений селекции. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2006;92(4):499-505.
- Амстиславская Т.Г., Гладких Д.В., Белоусова И.И., Маслова Л.Н., Колосова Н.Г. Возрастные аспекты сексуального поведения самцов крыс с различным темпом старения. *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*. 2010;60(5):552-559.
- Амстиславская Т.Г., Осипов К.В. Половая активация самцов крыс: поведение и гормональный ответ. *Бюл. СОРАМН*. 2003;3:112-114.
- Амстиславская Т.Г., Храпова М.В. Влияние генотипа на поведенческую и гормональную компоненты половой активации самцов мышей. *Бюл. эксперим. биол. мед.* 2002;133:548-551.
- Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. Селекция на предрасположенность к каталепсии усиливает депрессивно-подобное поведение у мышей. *Генетика*. 2005;41:1222-1228.
- Белоусова И.И., Гладких Д.В., Железова А.И., Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Амстиславская Т.Г. Возрастные аспекты репродуктивной функции самцов крыс с обычным и ускоренным темпом старения. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2009;95(11):1258-1267.
- Колпаков В.Г., Куликов А.В., Алехина Т.А., Чугуй В.Ф., Петренко О.И., Барыкина Н.Н. Кататония или депрессия? Линия крыс ГК – генетическая животная модель психопатологии. *Генетика*. 2004;40(6):827-834.
- Рязанова М.А., Игонина Т.Н., Алехина Т.А., Прокудина О.И. Увеличение доли «нервных» животных в ходе селекции на кататонию: участие в кататонических реакциях центральных адренорецепторов. *Генетика*. 2012;48:1328-1335.
- Тихонова М.А., Отрошенко Е.А., Куликов А.В. Влияние хронического введения флуоксетина на выраженность полового мотивационного и социального поведения мышей линии ASC. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2010;96(2):163-172.
- Adelson S. Psychodynamics of hypersexuality in children and adolescents with bipolar disorder. *J. Am. Acad. Psychoanal. Dyn. Psychiatry*. 2010;38:27-45.
- Amstislavskaya T.G., Popova N.K. Female-induced sexual arousal in male mice and rats: behavioral and testosterone response. *Horm. Behav.* 2004;46(5):544-550.
- Amstislavskaya T.G., Maslova L.N., Gladkikh D.V., Belousova I.I., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on sexually motivated behavior in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2010;96(2):211-216.
- Baldwin D.S. Sexual dysfunction associated with antidepressant drugs. *Expert. Opin. Drug Saf.* 2004;3(5):457-470.

- Clayton A.H., Montejo A.L. Major depressive disorder, antidepressants, and sexual dysfunction. *Clin. Psychiatry*. 2006;67:33-37.
- Ferreira-Nuno A., Overstreet D.H., Morales-Otal A., Velazquez-Moctezuma J. Masculine sexual behavior features in the Flinders sensitive and resistant line rats. *Behav. Brain Res.* 2002;128:113-119.
- Gronli J., Murison R., Fiske E., Bjorvatn B., Sorensen E., Portas C.M., Ursin R. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiol. Behav.* 2005;84(4):571-577.
- Henry C.J., Huang Y., Wynne A., Hanke M., Himler J., Bailey M.T., Sheridan J.F., Godbout P.J. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J. Neuroinflamm.* 2008;5(15):1-14.
- Kulikov A.V., Kolpakov V.G., Popova N.K. The genetic cataleptic (GC) rat strain as a model of depressive disorders. *Animal Models in Biological Psychiatry*. Ed. A. Kaluev. N.Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2006.
- Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice. *Genes Brain Behav.* 2008;7(4):506-512.
- Pfaus J.G. Revisiting the concept of sexual motivation. *Annu. Rev. Sex Res.* 1999;10:120-156.
- Roney J.R., Lukaszewski A.W., Simmons Z.L. Rapid endocrine responses of young men to social interactions with young women. *Horm. Behav.* 2007;52(3):326-333.
- Rösing D., Klebingat K.J., Berberich H.J., Bosinski H.A., Loewit K., Beier K.M. Male sexual dysfunction: diagnosis and treatment from a sexological and interdisciplinary perspective. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2009;106:821-828.
- Sanberg P.R., Bunsey M.D., Giordano M., Norman A.B. The catalepsy test: Its ups and downs. *Behav. Neurosci.* 1988;102:748-759.
- Tikhonova M.A., Yu C.H., Kolosova N.G., Gerlinskaya L.A., Maslennikova S.O., Yudina A.V., Amstislavskaya T.G., Ho Y.J. Comparison of behavioral and biochemical deficits in rats with hereditary defined or D-galactose-induced accelerated senescence: evaluating the protective effects of diosgenin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014;120:7-16.
- Wang D., Noda Y., Tsunekawa H., Zhou Y., Miyazaki M., Senzaki K., Nabeshima T. Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. *Behav. Brain Res.* 2007;178:262-273.

Исследование методом функциональной магнитно-резонансной томографии нейрональной реакции на запаховые стимулы у контрольных и ЛПС-стимулированных мышей

А.Е. Акулов¹, А.В. Ромащенко¹, О.Б. Шевелев¹, Д.В. Петровский¹, А.А. Савелов², М.П. Мошкин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт «Международный томографический центр Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Обонятельная рецепция является одним из важнейших механизмов взаимодействия организма с окружающей средой. У животных с ночной активностью, к которым относятся мыши, первичное восприятие и вторичная переработка запаховых стимулов позволяют ориентироваться в социальной среде, избегать хищников и отвергать опасные кормовые объекты. Эффективность обонятельной перцепции варьирует в зависимости от физиологического состояния организма, в частности она может изменяться при активации механизмов иммунной защиты. В данной работе методом функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) исследовано влияние активации врожденного иммунитета на нейрональную реакцию при восприятии и дифференцировке социально значимых (2,5-диметилпиразин, 2-гептанон) и социально незначимых (1-гексанол и изопрен) запаховых стимулов мышами линии CD1. Для стимуляции механизмов врожденного иммунитета подопытным животным за три часа до помещения в томограф внутрибрюшинно вводили бактериальный липополисахарид (ЛПС) в дозе 500 мкг/кг. Томографическое исследование выполняли на животных, находящихся под уретановым наркозом. Запаховую стимуляцию выполняли с помощью разработанной в лаборатории установки для дозированной подачи летучих органических соединений. Подача ольфакторных стимулов вызывала активацию нейронов в центрах первичного восприятия и вторичной обработки запаховой информации. Тип запахового стимула влиял на величину нейрональной реакции в обонятельной луковице, но не влиял на параметры ответа в других исследованных областях мозга. Активация врожденного иммунитета приводила к увеличению площади нейронального отклика как в обонятельной луковице – центре первичного реагирования, так и в областях вторичной обработки запаховой информации. Повышение нейрональной активности может иметь адаптивное значение как механизм, обеспечивающий рост обонятельной чувствительности, которая играет ключевую роль в идентификации потенциальных источников заражения.

Ключевые слова: функциональная магнитно-резонансная томография; запахи; ЛПС; мыши линии CD1; врожденный иммунитет; обонятельная луковица.

Study of the neuronal response to olfactory stimuli in control and LPS-stimulated mice by functional magnetic resonance imaging

A.E. Akulov¹, A.V. Romashchenko¹, O.B. Shevelev¹, D.V. Petrovski¹, A.A. Savelov², M.P. Moshkin¹

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

² International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk, Russia

Olfactory perception plays the key role in the interaction of animals with biotic factors of the species-specific niche. Identification of odorants informs nocturnal animals about social environment, presence of predators, or infected food. Olfactory efficiency depends on physiological conditions; in particular, odor sensitivity can be changed by infection. This work considers use of fMRI in the study of the influence of innate immunity activation on neuronal response during perception and differentiation of socially significant (2.5-dimethylpyrazine, 2-heptanone) and socially insignificant (1-hexanol and isoprene) olfactory stimuli by CD-1 mice. We stimulated innate immunity by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) at the dose 500 µg/kg three hours before tomography. Urethane anesthesia was used during MRI trial. Odor stimulation was done with a lab-made metering unit for supplying standard doses of volatile organic compounds. The supply of olfactory stimuli induced activation of neurons in the primary perceptual center and the centers of secondary processing of olfactory information. Olfactory stimulus type affected neuronal response rate in an olfactory bulb but did not affect response parameters in other brain regions studied. This increase in neuronal activity is likely to be of adaptive significance as a mechanism

supporting olfactory sensitivity increase, which plays the key role in the identification of potential sources of infection.

Key words: functional magnetic resonance imaging (fMRI); odorants; lipopolysaccharide; CD1 mice; innate immunity; olfactory bulb.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Акулов А.Е., Ромащенко А.В., Шевелев О.Б., Петровский Д.В., Савелов А.А., Мошкин М.П. Исследование методом функциональной магнитно-резонансной томографии нейрональной реакции на запаховые стимулы у контрольных и ЛПС-стимулированных мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):420-426. DOI 10.18699/VJ15.055

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Akulov A.E., Romashchenko A.V., Shevelev O.B., Petrovski D.V., Savelov A.A., Moshkin M.P. Study of the neuronal response to olfactory stimuli in control and LPS-stimulated mice by functional magnetic resonance imaging. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):420-426. DOI 10.18699/VJ15.055

Запаховые сигналы играют важную роль в жизни млекопитающих и наравне с коммуникативными функциями, информацией о пище и хищниках способны выступать в роли источников информации о физиологическом состоянии организма (Hurst et al., 1993; Drickamer, 2001). Изменчивость запахов под влиянием активации иммунной защиты и паразитарной инвазии многократно продемонстрирована в научных работах (Moshkin et al., 2001, 2002). При этом заостряется внимание на особой роли низкомолекулярных органических соединений, входящих в запаховые композиции (НМОС). НМОС являются ключевыми социальными сигналами у многих видов грызунов (Novotny et al., 1986). Список таких соединений достаточно велик (Tirindelli et al., 2009), что обеспечивает их широкие сигнальные функции. Восприятие их периферическими отделами обонятельной системы и передача в корковые и подкорковые структуры мозга способны запускать у реципиента различные формы поведения, а также многие физиологические и иммунные процессы (Barnard et al., 1997; Litvinova et al., 2010).

Вместе с тем процесс распознавания запаховых сигналов зависит от собственного физиологического состояния организма и подвержен изменениям при развитии патологических процессов (Andersen et al., 1999; Naehner et al., 2014), в частности восприятие запахов изменяется при оксидативном стрессе и старении (Bhatnagar et al., 1987; Chen et al., 1993). Также стоит ожидать нарушения восприятия запаховых стимулов при иммунных и аутоиммунных заболеваниях. Так, поведенческое и физиологическое действие одного из центральных провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 – определяется его непосредственным влиянием на гипоталамическую область мозга (Breder et al., 1988). Показано, что цитокины, достигающие мозг, влияют не только на терморегуляцию, но и на деятельность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и способны модулировать такие поведенческие функции, как прием пищи или сон (Krueger et al., 1984). Исследования с использованием только одного цитокина не в полной мере моделируют патоген, встречающийся в природе и вызывающий сложный каскад цитокиновых взаимодействий. Поэтому в исследованиях, посвященных влиянию воспалительных факторов, принято использовать введение очищенного эндотоксина, не приводящего к развитию патологии, но вызывающего иммунный ответ. Бактериальный эндотоксин – липополисахарид (ЛПС) – вызывает кратковременную активацию иммунной

системы через Toll-подобный рецептор 4 (TLR4). Активация врожденного иммунитета, вызванная введением ЛПС, не только влияет на функции мозга, непосредственно связанные с болезнью, но также изменяет нейropsychологические функции, такие как обучение и память (Gibertini et al., 1995; Pugh et al., 1998; Shaw et al., 2001). Это влияние может происходить на этапах не только обучения и формирования памяти, но и восприятия информации.

Возможность создать временную воспалительную реакцию в хорошо контролируемых экспериментальных условиях позволила использовать методы визуализации, такие как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ), для анализа нейрофизиологических изменений, связанных с формированием синдрома болезненного поведения. В данной работе методом фМРТ мы исследовали влияние активации врожденного иммунного ответа на характер ответных реакций нейронов обонятельной луковицы и других структур головного мозга на запаховые стимулы разной модальности.

Материалы и методы

Исследование проведено в центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914 X0005 и RFMEFI62114X0010) на 40 самцах мышей линии CD1 SPF-статуса. Животных содержали группами по 5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice cage, Animal Care, США). Подстилка в клетках была из обеспыленных опилок, воду и корм животные получали *ad libitum*. В комнате содержания животных были установлены световой режим 12С : 12Т и температура 22–24 °С. Полная смена объема воздуха в клетках происходила 20 раз в час. Отсутствие постороннего запахового воздействия на животных контролировали за счет их содержания в индивидуально вентилируемых клетках.

Запаховые стимулы

Использованные в эксперименте запаховые вещества (изопрен, 1-гексанол, 2,5-диметилпиразин, 2-гептанон) были произведены Sigma-Aldrich. Краткая характеристика использованных нами веществ: изопрен (C₅H₈, молекулярная масса – 68,117, температура кипения – 34,067 °С), 1-гексанол (C₆H₁₄O, молекулярная масса – 102,175, температура кипения – 157,2 °С), 2,5-диметилпиразин (C₆H₈N₂, молекулярная масса – 108,141, температура ки-

пения – 155 °С), 2-гептанон (C₇H₁₄O, молекулярная масса – 114,185, температура кипения – 151,45 °С). Предъявление проводилось в следующих концентрациях: изопрен – 10⁻⁴; 1-гексанол – 10⁻³; 2,5-диметилпиразин – 10⁻³; 2-гептанон – 10⁻³.

Функциональная магнитно-резонансная томография

За три часа до томографического исследования животных взвешивали и в пересчете на массу тела одной группе животных вводили ЛПС в дозе 500 мкг/кг, а другой – физиологический раствор в эквивалентном объеме, после чего животных возвращали в клетки содержания. Всего было сформировано 8 групп животных – 4 контрольных, получавших в качестве запаховых стимулов 2,5-диметилпиразин, 2-гептанон, изопрен и 1-гексанол, а также 4 группы, у которых реакция на перечисленные запахи была исследована на фоне активации врожденного иммунного ответа (введение ЛПС). За 10 мин до начала фМРТ животных наркотизировали внутрибрюшинным введением уретана (75 мг/кг). Наркотизированных животных помещали на подогреваемый матрас (температура поверхности – 30 °С), установленный на столике томографа. Под нижнюю часть туловища животных помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, США). К животному подводили маску, соединенную фторопластовой трубкой с системой дозированной подачи запахов. После настройки томографического оборудования и получения морфологической информации запускали синхронизированный процесс подачи запаха и регистрацию фМРТ.

Система для подачи химических стимулов (рис. 1) является модифицированным нами вариантом описанного ранее устройства (Kauer, Moulton, 1974). Несущий запаховый стимул воздух подавался со скоростью 20–25 мл/мин. Период отсутствия подачи запаха реализовывался принудительно за счет включения дополнительного насоса, осуществляющего сброс воздуха, несущего запаховый стимул, в атмосферу в большем объеме, чем основной поток (30–35 мл/мин). Исходный объем

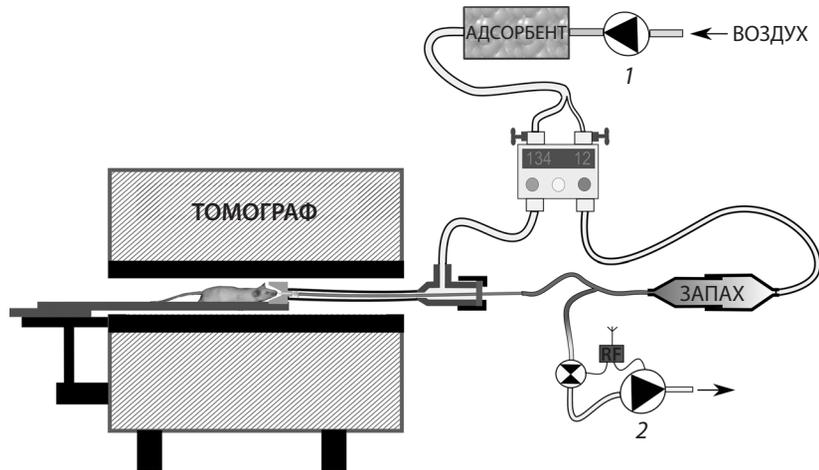


Рис. 1. Схема установки для исследования методом фМРТ нейрональной реакции на дозированную подачу запаховых стимулов.

1 – основной насос подачи воздуха; 2 – дополнительный насос принудительного сброса воздуха, содержащего запаховый стимул.

используемого одоранта – 15 мкл раствора, нанесенного на фильтровальную бумагу площадью 45 мм². Источник одоранта помещали один раз в начале регистрации фМРТ.

Регистрация фМРТ проходила на протяжении 40 мин. Ольфакторная стимуляция была проведена пять раз: чередование периодов подачи запаха и покоя 5+2+5+2+5+2+5+2+5+2+5, где 2 – интервал времени в минутах с предоставлением запаха; 5 – интервал времени в минутах без предоставления запаха. По завершении фМРТ животных извлекали из томографа и помещали в отдельные клетки до возвращения животных к нормальному физиологическому состоянию.

фМРТ выполнена на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) при 11,7Т методом EPI (Echo Planar Imaging). Параметры импульсной последовательности метода: TE₁/TE₂ = 16/40 мсек, TR = 2000 мсек; количество срезов = 3 (4; 1,5; –1,5 мм от «bregma» в соответствии с атласом Dong, 2008); параметры изображения – 2 см × 2 см, матрица 128 × 128 пикселей, толщина среза – 0,5 мм; количество повторений – 300, общее время сканирования – 40 минут. Для улучшения соотношения сигнал/шум проводили дополнительную настройку однородности поля при помощи метода FastMap, а также использовали метод размещения срезов подавления сигнала для областей мозга, не подвергающихся исследованию.

Обработка данных функциональной магнитно-резонансной томографии

С помощью программы ParaVision 5.0 проводили конвертацию данных томографа в общедоступные форматы «.img» и «.hdr». Обработку данных фМРТ проводили на основе программы SPM8, созданной на базе Matlab, Inc. Обработку выполняли по стандартным протоколам (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/). В процессе обработки для каждого среза в каждой сессии были рассчитаны амплитуда и площадь BOLD-ответа (blood oxygen level dependent – уровень оксигенации ткани, лежит в основе фМРТ ответа).

Статистическая обработка данных

Для проверки экспериментальных данных на нормальность распределения использовался критерий Колмогорова–Смирнова. Данные были представлены в виде средних величин со статистическими ошибками средних. Для оценки влияния запахового сигнала и активации иммунной системы на нейрональную

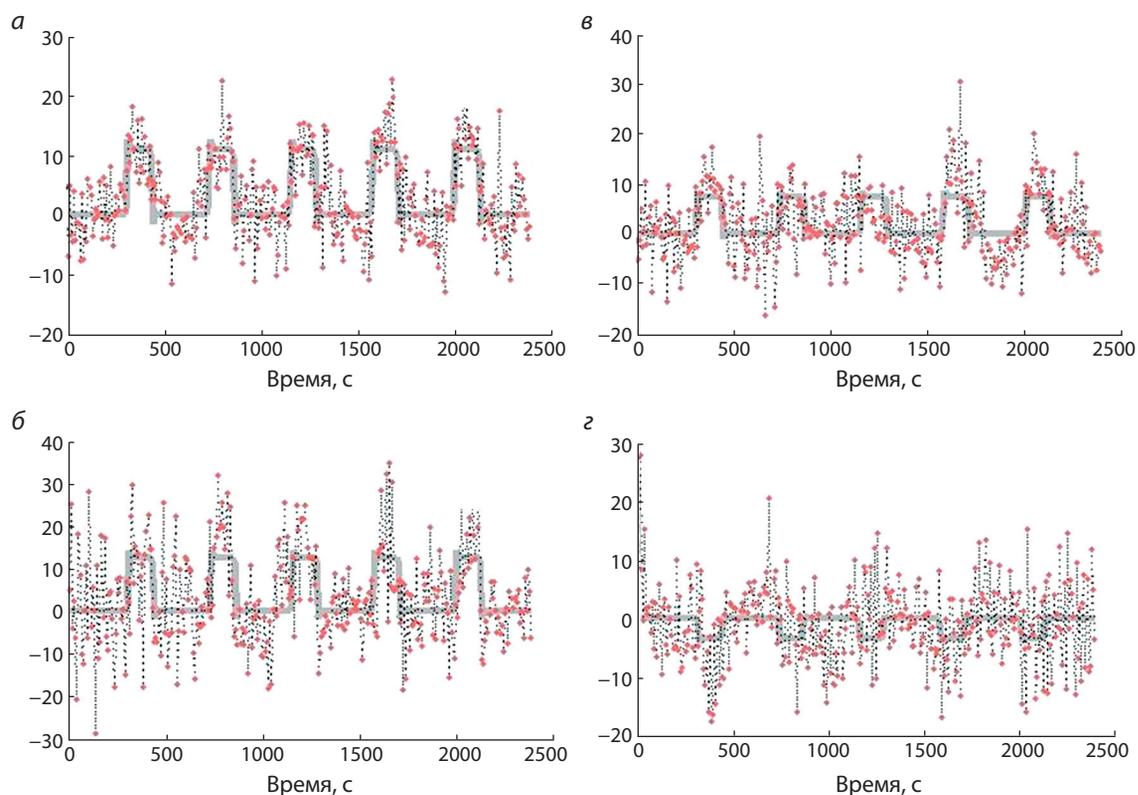


Рис. 2. Динамика BOLD-ответа при повторных предъявлениях изопрена (а); 1-гексанола (б); 2-гептанона (в) и 2,5-диметилпиридина (г).

Пунктирная линия с круглыми маркерами отображает изменение интенсивности сигнала (активность нейронов) обонятельной луковицы. Сплошная линия показывает чередование периодов подачи запаха и покоя.

реакцию головного мозга применяли многофакторный дисперсионный анализ ANOVA с факторами введения ЛПС и типа запахового стимула.

Результаты

Предоставление изопрена, 1-гексанола и 2-гептанона вызывало активацию нейронов головного мозга (рис. 2, а, б, в). Вместе с тем запах 2,5-диметилпиридина приводил к снижению активности нейронов, что отражала отрицательная направленность BOLD-ответа на всех исследованных срезах головного мозга (рис. 2, г). Для количественных сравнений разнонаправленных реакций нейронов на 2,5-диметилпиридин и другие стимулы анализировали значения модуля BOLD-ответа. Используемые в работе запаховые сигналы характеризуются разной степенью летучести. Поскольку помещение источника запахового сигнала в систему подачи запаха производилось один раз, то неодинаковые изменения амплитуды BOLD-ответа на протяжении фМРТ исследования отражали различия в летучести запаховых стимулов. В дальнейшем для сравнения реакций на разные запахи использовали данные BOLD-ответа только при первом предъявлении стимула, не проводя суммирование всех пяти периодов подачи запаха.

ЛПС-стимуляция приводила к увеличению в сравнении с контролем нейрональной реакции во всех исследо-

ванных срезах головного мозга при предъявлении всех четырех запахов (пример сравнения карт зон активности в контроле и при ЛПС-стимуляции в ответ на подачу 1-гексанола представлен на рис. 3).

Нейрональная реакция (модуль площади BOLD-ответа) различных отделов мозга на запаховые стимулы контрольным и ЛПС-стимулированным животным отражена в таблице.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что площадь BOLD-ответа в обонятельной луковице варьировала в зависимости от подаваемого типа запаха ($F_{3,30} = 7,68, p < 0,001$) и от активации врожденного иммунитета ($F_{1,30} = 13,34, p < 0,001$). Площадь BOLD-ответа в латеральном обонятельном тракте не зависела от предъявляемого запахового стимула ($F_{3,30} = 1,34, p > 0,1$), но зависела от активации иммунного ответа ($F_{1,30} = 7,95, p < 0,01$). Подобный результат характерен и для центров вторичной обработки информации ($F_{3,30} = 2,31, p > 0,05$ – для запаха и $F_{1,30} = 5,39, p < 0,05$ – для активации иммунной защиты).

Обсуждение

До сих пор удивительно мало исследований посвящено нейрональному кодированию обонятельной информации. Во многом это связано с технологическими трудностями при проведении таких исследований. В нашей работе

использование сверхвысокопольного томографа, предназначенного для исследования мелких лабораторных животных, а также разработанной установки по дозированной подаче запахов, совместимой с МРТ оборудованием, позволило охарактеризовать нейрональный ответ на конкретный запаховый стимул в норме и при активации врожденного иммунитета.

Использование разных запаховых сигналов приводило к изменению уровня нейронального отклика в обонятельной луковице контрольных животных. Подобная зависимость может быть объяснена взаимодействием запаховых сигналов с разными рецепторами обонятельного эпителия, имеющих соответствующую проекцию в обонятельной луковице. В работах Xu с соавт. (Xu et al., 2003, 2005; Johnson et al., 2004) продемонстрирована зависимость величины нейронального отклика обонятельной луковицы от длины углеводородной цепи сигнального вещества. В исследовании анализировали алифатические альдегиды, сложные этиловые эфиры, ацетаты, кетоны и спирты. Авторами были отмечены снижение нейронального ответа по ходу удлинения углеводородной цепи, а также наличие порога при длине C9, свыше которого вещества не оказывали выраженного стимулирующего эффекта. Используемые нами запаховые соединения имеют разные физико-химические характеристики и длину углеводородной цепи. Исходя из данных Xu мы могли ожидать зависимость нейронального ответа в обонятельной луковице от длины углеводородной цепи. Действительно, с удлинением углеводородной цепи мы также отмечаем снижение нейронального ответа в обонятельной луковице. Меньшая величина нейрональной реакции на изопрен (C5) по сравнению с 1-гексанолом (C6) объясняется тем, что в наших опытах концентрация 1-гексанола была в десять раз меньше по сравнению с другими веществами. Также обращает на себя внимание отличная от других использованных запахов нейрональная реакция на 2,5-диметилпиразин. Известно, что 2,5-диметилпиразин экскретируется самками мышей либо в стадии метаструсы, либо в состоянии стресса, вызванного перенаселением (Ma et al., 1998). Для

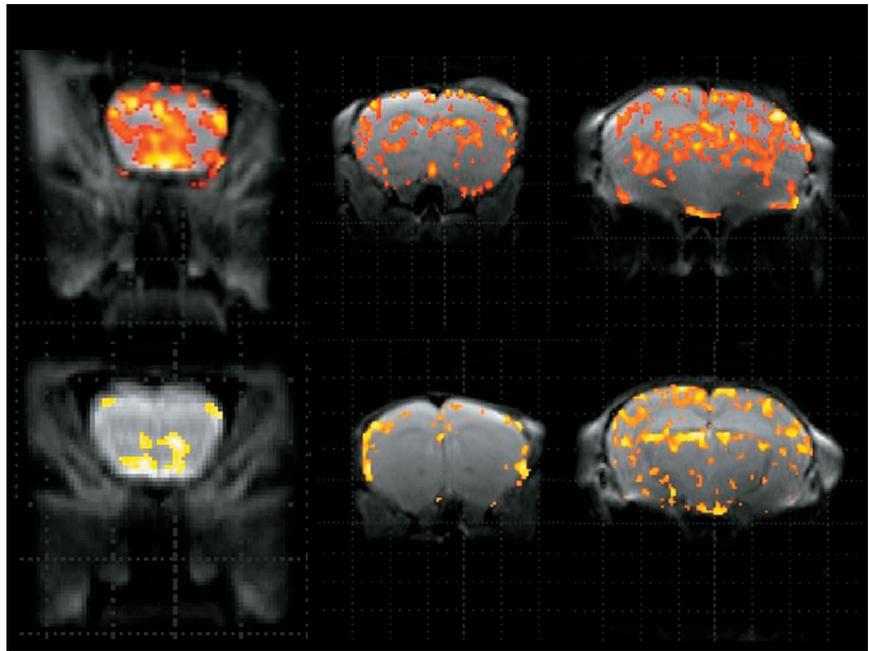


Рис. 3. Зоны активации нейронов (отмечены цветом) в ответ на 1-гексанол в трех срезах головного мозга при предъявлении 1-гексанола.

Слева направо: первый срез – обонятельная луковица, центр первичной обработки обонятельной информации; второй срез – латеральный обонятельный тракт, передача информации; третий срез – центры вторичной обработки информации. Верхний ряд – реакция на 1-гексанол на фоне активации врожденного иммунитета; нижний ряд – реакция на 1-гексанол в контроле.

самцов мышей 2,5-диметилпиразин сигнализирует о преобладании нерцептивных самок, что делает оправданным подавление обонятельной реакции на их присутствие.

Важной составляющей частью исследования стало сравнительное изучение нейрональной реакции на запаховые стимулы у животных на фоне активации врожденного иммунитета. Активация врожденного иммунитета сопровождается развитием множества симптомов, комплекс которых получил особое название «синдром болезненного поведения» (Dantzer, 2001). Для него характерно изменение целого ряда поведенческих актов: снижение локомоторной активности, отказ от поиска и принятия пищи, снижение активности в контакте с конспецификами, ангедония. В основе подобных реакций лежат взаимодействия между клетками иммунитета и нервной системы. В мировой литературе неоднократно поднимался вопрос о возможном искажении восприятия, обработки и дифференцировки запаховых сигналов в процессе активации иммунной системы (Kalkonde et al., 2011; Sultan et al., 2011). Судя по результатам нашего исследования, активация врожденного иммунитета не отразилась на способности животных воспринимать запаховые стимулы. Величина площади нейронального ответа в обонятельной луковице, как и у контрольных животных, зависела от вида запахового стимула, вещества с более длинной углеводородной цепью также вызывали некоторое снижение нейронального отклика, а реакция на 2,5-диметилпиразин характеризовалась негативным BOLD-ответом. Вместе с тем для всех ЛПС-стимулированных животных вне зависимости от запахового стимула отмечается повышенная в сравнении с контролем величина нейрональной реакции как в обонятельной луковице, так и в других отделах мозга. В ряде работ, проведенных на людях, показано, что выполнение познавательной задачи на фоне воспаления усиливает BOLD-ответ в таких областях мозга, как ствол мозга, как ствол мозга и миндалина (Kullmann et al., 2014). Кроме того, обслуживание когнитивных функций во время воспаления приводит к активации дополнительных областей префронтальной коры (Harrison et al., 2009b). Еще в одной работе той же группы авторов показано, что увели-

Модули площадей BOLD-ответа в разных структурах головного мозга контрольных и иммунизированных животных (ЛПС) в ответ на предъявление запаховых стимулов

Стимул	Площадь BOLD-ответа в пикселях (среднее ± SE)		
	Обонятельная луковица	Латеральный ольфакторный тракт	Центры вторичной обработки информации
Изопрен	40,0 ± 20,2	89,0 ± 24,9	47,6 ± 31,6
1-гексанол	105,0 ± 35,5	99,6 ± 49,8	123,6 ± 55,4
2,5-диметилпиразин*	43,6 ± 17,6	29,0 ± 13,5	15,0 ± 9,0
2-гептанон	8,0 ± 4,8	19,4 ± 10,2	27,4 ± 14,8
Изопрен ЛПС	173,0 ± 111,9	449,7 ± 196,4	208,7 ± 108,2
1-гексанол ЛПС	366,2 ± 82,0	545,4 ± 310,4	837,0 ± 425,3
2,5-диметилпиразин ЛПС	98,6 ± 49,3	263,6 ± 144,6	246,2 ± 96,5
2-гептанон ЛПС	49,0 ± 25,8	126,0 ± 49,8	128,0 ± 67,8

* Реакция на 2,5-диметилпиразин имела во всех отделах мозга отрицательную направленность и представлена в таблице как модуль BOLD-ответа.

чение активности в поле Бродмана 25 (subgenual anterior cingulate cortex, отвечает за регулирование эмоциональной мимики лица) изменяется через 3 ч после инъекции вакцины вместе с увеличением активности областей мозга, отвечающих за настроение (Harrison et al., 2009a). Таким образом, совокупность результатов разных исследований подталкивает к заключению о том, что при активации некоторых иммунных механизмов происходит вовлечение дополнительного числа нейронов в процессы мозговой деятельности. А сохранение ЛПС-стимулированными животными способности идентифицировать запаховые стимулы (по результатам фМРТ обонятельной луковицы) с вовлечением дополнительного числа нейронов в процесс запаховой перцепции, с эволюционной точки зрения, можно объяснить необходимостью усиленного мониторинга запахового окружения как источника информации о потенциальной опасности инфицирования.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований, выполненных на людях. Повышение ольфакторной чувствительности на фоне «синдрома болезненного поведения» может иметь адаптивное значение, обеспечивая более эффективное запаховое дифференцирование корма, который может быть новым источником заражения. Результаты данного исследования демонстрируют возможность использования фМРТ при оценке нейрональной реакции на запаховые стимулы как методического подхода для выявления отклонений, которые могут развиваться при моделировании на лабораторных животных психосоматических нарушений.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-31829). Обработка данных функциональной магнитно-резонансной томографии при помощи Matlab, Inc проведена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00020).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Andersen M.B., Zimmer J., Sams-Dodd F. Specific behavioral effects related to age and cerebral ischemia in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999;62(4):673-682.
- Barnard C.J., Behnke J.M., Gage A.R., Brown H., Smothurst P.R. Immunity cost and behavioural modulation in male laboratory mice exposed to the odour of females. *Physiol. Behav.* 1997;62:857-866.
- Bhatnagar K.P., Kennedy R.C., Baron G., Greenberg R.A. Number of mitral cells and the bulb volume in the aging human olfactory bulb: a quantitative morphological study. *Anat. Rec.* 1987;218(1):73-87.
- Breder C.D., Dinarello C.A., Saper C.B. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science.* 1988;240:321-324.
- Chen Y., Getchell T.V., Sparks D.L., Getchell M.L. Patterns of adrenergic and peptidergic innervation in human olfactory mucosa: age-related trends. *J. Comp. Neurol.* 1993;334(1):104-116.
- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: Where do we stand? *Brain Behav. Immun.* 2001;15:7-24.
- Dong H.W. The Allen Reference Atlas: A Digital Color Brain Atlas of C57BL/6J Male Mouse. John Wiley & Sons, 2008.
- Drickamer L.C. Urine marking and social dominance in male house mice (*Mus musculus domesticus*). *Behav. Process.* 2001;53:113-120.
- Gibertini M., Newton C., Friedman H., Klein T.W. Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1-beta. *Brain. Behav. Immun.* 1995; 9:113-128.
- Haehner A., Hummel T., Reichmann H. A clinical approach towards smell loss in Parkinson's disease. *J. Parkinson's. Dis.* 2014;4(2): 189-195. DOI: 10.3233/JPD-130278
- Harrison N.A., Brydon L., Walker C., Gray M.A., Steptoe A., Critchley H.D. Inflammation causes mood changes through alterations in subgenual cingulate activity and mesolimbic connectivity. *Biol. Psychiat.* 2009a;66:407-414.
- Harrison N.A., Brydon L., Walker C., Gray M.A., Steptoe A., Dolan R.J., Critchley H.D. Neural origins of human sickness in interoceptive responses to inflammation. *Biol. Psychiat.* 2009b;66:415-422.
- Hurst J.L., Fang J., Barnard C.J. The role of substrate odours in maintaining social tolerance between male house mice, *Mus musculus domesticus*. *Anim. Behav.* 1993;45:997-1006.
- Johnson B.A., Farahbod H., Xu Z., Saber S., Leon M. Local and global chemotopic organization: general features of the glomerular repre-

- sentations of aliphatic odorants differing in carbon number. *J. Comp. Neurol.* 2004;480:234-249.
- Kalkonde Y.V., Shelton R., Villarreal M., Sigala G., Mishra P.K., Ahuja S.S., Barea-Rodriguez E., Moretti P., Ahuja S.K. The CC chemokine receptor 5 regulates olfactory and social recognition in mice. *Neuroscience.* 2011;197:153-161.
- Kauer J.S., Moulton D.G. Responses of olfactory bulb neurons to odour stimulation of small nasal areas in the salamander. *J. Physiol.* 1974;243:717-737.
- Krueger J.M., Walter J., Dinarello C.A., Wolff S.M., Chedid L. Sleep-promoting effects of endogenous pyrogen (interleukin-1). *Am. J. Physiol.* 1984;246:994-999.
- Kullmann J.S., Grigoleit J.S., Wolf O.T., Engler H., Oberbeck R., Elsenbruch S., Forsting M., Schedlowski M., Gizewski E.R. Experimental human endotoxemia enhances brain activity during social cognition. *Soc. Cogn. Affect Neurosci.* 2014, 9(6):786-793. DOI.org/10.1093/scan/nst049
- Litvinova E.A., Goncharova E.P., Zaydman A.M., Zenkova M.A., Moshkin M.P. Female scent signals enhance the resistance of male mice to influenza. *PLoS One.* 2010;5(3):e9473. DOI: 10.1371/journal.pone.0009473
- Ma W., Miao Z., Novotny M.V. Role of the adrenal gland and adrenal-mediated chemosignals in suppression of estrus in the house mouse: the lee-boot effect revisited. *Biol. Reprod.* 1998;59:1317-1320.
- Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Evsikov V.I. Behaviour, chemosignals, and endocrine functions in male mice infected with tick-borne encephalitis virus. *Psychoneuroendocrinology.* 2002;27(5):603-608.
- Moshkin M.P., Kolosova I.E., Novikov E.A., Litvinova E.A., Mershieva L.V., Mak V.V., Petrovskii D.V. Co-modulation of the immune function and the reproductive chemosignals. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2001;14:43-51.
- Novotny M., Jemiolo B., Harvey S., Wiesler D., Marchlewska-Koj A. Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science.* 1986;231:722-725.
- Pugh C.R., Kumagawa K., Fleshner M., Watkins L.R., Maier S.F., Rudy J.W. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain Behav. Immun.* 1998;12:212-229.
- Shaw K.N., Commins S., O'Mara S.M. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behav. Brain Res.* 2001;124:47-54.
- Sultan B., May L.A., Lane A.P. The role of TNF- α in inflammatory olfactory loss. *Laryngoscope.* 2011;121(11):2481-2486.
- Tirindelli R., Dibattista M., Pifferi S., Menini A. From pheromones to behavior. *Physiol. Rev.* 2009;89:921-956. DOI: 10.1152/physrev.00037.2008
- 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.
- Xu F., Schaefer M., Kida I., Liu N., Rothman D.L., Hyder F., Resrtreppo D., Shepherd G.M. Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J. Comp. Neurol.* 2005;489(4):491-500.

Метаболиты мозга у крыс линий НИСАГ и Вистар

О.Б. Шевелев, А.А. Серяпина, А.Л. Маркель, М.П. Мошкин

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

Гипертоническая болезнь относится к одному из наиболее распространенных заболеваний человека. Эта болезнь приводит к таким серьезным нарушениям, как инфаркт миокарда, инсульт. Благодаря развитию спектроскопии ядерно-магнитного резонанса показано, что у людей с артериальной гипертензией наблюдается снижение жизнеспособности нейронов различных отделов головного мозга. Трансляция в клиническую практику методов спектроскопии ядерно-магнитного резонанса требует накопления эмпирических данных об изменениях нейрометаболизма в условиях строго контролируемого эксперимента. В частности, представляет интерес сравнение метаболомных параметров у лабораторных животных с нормальным и повышенным артериальным давлением, содержащихся в стандартных условиях, на одинаковой диете. В представленной работе исследованы метаболиты коры головного мозга и гипоталамуса самцов крыс гипертензивной линии НИСАГ (ISIAH) и нормотензивной линии Wistar в возрасте 8–9 нед. У животных, находящихся под газовым наркозом (изофлюран), проводили методом протонной спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (^1H МРС) измерение метаболитов в коре головного мозга и гипоталамусе. Обработка первичных данных с помощью анализа Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) позволила выделить основную дискриминирующую ось (Y_1), вариации которой отражали преобладание возбуждающих нейрометаболитов (глутамина и глутамата) над тормозными (ГАМК и глицином). Значения оси Y_1 в коре головного мозга были выше у крыс линии Wistar по сравнению с линией НИСАГ, что указывает на снижение возбудимости коры головного мозга у гипертензивных животных. В гипоталамусе, наоборот, величина оси Y_1 была выше у крыс линии НИСАГ, чем у крыс линии Wistar. При этом преобладание возбуждающих нейрометаболитов положительно коррелировало с уровнем среднего артериального давления, что хорошо согласуется с представлением об активации каудальных отделов гипоталамуса у гипертензивных животных.

Ключевые слова: метаболиты головного мозга; ^1H МРС; гипертензия; Рейши.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Шевелев О.Б., Серяпина А.А., Маркель А.Л., Мошкин М.П. Метаболиты мозга у крыс линий НИСАГ и Вистар. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):427–431. DOI 10.18699/VJ15.056

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Shevelev O.B., Seryapina A.A., Markel A.L., Moshkin M.P. Brain metabolites in ISIAH and Wistar rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):427–431. DOI 10.18699/VJ15.056

DOI 10.18699/VJ15.056

УДК 577.121

Поступила в редакцию 17.07.2015 г.

Принята к публикации 31.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: shevelev.oleg.nsk@gmail.com; mmp@bionet.nsc.ru

Brain metabolites in ISIAH and Wistar rats

O.B. Shevelev, A.A. Seryapina, A.L. Markel, M.P. Moshkin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Hypertension is one of the most common human diseases. This disease leads to serious disturbances such as myocardial infarction and stroke. Due to the development of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMRS), a decrease in neuron viability in different parts of the brain in humans with hypertension has been shown. Translation of NMRS tools to the clinic requires the accumulation of empirical data about neurometabolic changes in a strictly controlled experiment. It is particularly interesting to compare the metabolic parameters of laboratory animals with normal and high blood pressure kept in the standard conditions on exactly the same diet. In this study, cortex and hypothalamus metabolites of ISIAH and Wistar male rats at the age of 8–9 weeks were examined. Cortex and hypothalamus metabolites were measured in animals under isoflurane anesthesia using proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS). Processing of primary data using Partial least squares Discriminant Analysis (PLS-DA) allowed us to identify the main discriminating axis (Y_1), its variations reflecting the predominance of excitatory neurometabolites (glutamine and glutamate) over inhibitory ones (GABA and glycine). In the cortex, the values of the Y_1 -axis were lower in ISIAH than in Wistar rats. This fact indicates a decrease in cortical excitability in hypertensive animals. By contrast, in the hypothalamus, the values of the Y_1 -axis were higher in ISIAH than in Wistar rats and the predominance of excitatory neurometabolites positively correlated with the level of mean blood pressure, which agrees well with the view of caudal hypothalamic activation in hypertensive animal models.

Key words: brain metabolites; ^1H MRS; hypertension; Reishi.

Как известно, гипертоническая болезнь является болезнью века. Это заболевание выступает в роли фактора риска для инфаркта миокарда, инсульта и других сердечно-сосудистых нарушений. Кроме того, хроническое течение артериальной гипертензии сопровождается целым комплексом психосоматических отклонений, среди которых заметное место занимают приступы бессонницы, депрессия, падение умственной работоспособности и др. (Carnevale et al., 2012; Kayano et al., 2015). В качестве одной из причин нейронных расстройств рассматриваются дефицит кровоснабжения различных отделов мозга и, как следствие, изменения нейрометаболизма.

В последние годы благодаря развитию спектроскопии ядерно-магнитного резонанса, стало возможным изучение метаболитов головного мозга без очевидных негативных воздействий на пациентов. Эти исследования показали, что у лиц с артериальной гипертензией имеет место снижение уровня N-ацетиласпартата и холина во фронтальной коре головного мозга (Cao et al., 2015) и таламусе (Ben Salem et al., 2008), которые являются показателями жизнеспособности нейронов. Пока немногочисленные результаты спектроскопических исследований указывают на перспективность прижизненного определения параметров нейрометаболизма у пациентов с различными формами артериальной гипертензии. Для трансляции этой методологии в клиническую практику большое значение имеет накопление данных прижизненной спектроскопии мозга, полученных в условиях контролируемого лабораторного эксперимента, в частности при фенотипировании генетических линий мышей и крыс с наследственной артериальной гипертензией.

В ИЦиГ СО РАН методами селекции на значительное повышение артериального давления в условиях эмоционального стресса (Markel, 1992) получена генетическая линия крыс НИСАГ (наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия), которая и послужила объектом для изучения методом протонной спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (^1H МРС) особенностей метаболизма в коре головного мозга и гипоталамуса. Для сравнения были исследованы метаболиты тех же отделов мозга у крыс нормотензивной линии Wistar.

Материалы и методы

Экспериментальные животные и условия содержания

Всех животных содержали в соответствии с правилами Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН в условиях без патогенов. Исследование выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI62114X0010). Было исследовано 12 лабораторных крыс линии НИСАГ и 13 лабораторных крыс линии Wistar в возрасте 8–9 нед. Животных содержали по одному в индивидуально вентилируемых клетках высотой 20,5 см и площадью 929 см² (OptiRAT, Animal Care, США), при свободном доступе к воде и гранулированному корму для лабораторных грызунов SPF-категории содержания «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия), искусственном фотопериоде

14С:10Т, температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. В качестве подстилочного материала использовали сухие обеспыленные опилки (ООО «Альбион», Новосибирск). Корм и подстилку перед использованием автоклавировали при температуре 121 °С. Для поения животных использовали деионизированную воду, полученную на установке Millipore, после обогащения минеральной добавкой «Северянка» (ООО «Эко-Проект», Санкт-Петербург). Содержание и изучение животных выполнены в соответствии с нормами GLP и правилами Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

Схема эксперимента

За два дня до томографии у животных измеряли неинвазивным методом систолическое и диастолическое артериальное давление на аппарате CODA Standard (Kent Scientific Corporation, США). Среднее динамическое артериальное давление рассчитывали по формуле: (систолическое давление – диастолическое давление)/3 + диастолическое давление. Исследования нейрометаболитов проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, Biospec 117/16 USR, Германия). При помощи ^1H радиочастотных катушек исследовали диаметр брюшной аорты, почечных и сонных артерий, объемную скорость кровотока в указанных сосудах, а также уровни метаболитов коры головного мозга и гипоталамуса крыс. За 5 мин до исследования крыс обездвигивали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Malta). Температуру животных поддерживали благодаря использованию водного контура в томографическом столике-кроватке, имевшем температуру поверхности 30 °С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

^1H МРС. Все протонные спектры головного мозга крыс получены с использованием передающей объемной (500,3 МГц, диаметр 72/89 мм) и приемной поверхностной (500,3 МГц, размером 123 × 64 × 31 мм) ^1H радиочастотных катушек. Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей, размер которых составлял 1,6 × 4,0 × 3,0 мм, методом RARE (rapid with relaxation enhancement) с параметрами импульсной последовательности TE = 11 мс, TR = 2,5 с были сняты T2-взвешенные изображения головного мозга крысы высокого разрешения (толщиной среза 0,5 мм, полем обзора 2,5 × 2,5 см и размером матрицы 256 × 256 точек). Расположение вокселя на аксиальном срезе показано на рис. 1, а, б. Все протонные спектры получены с помощью пространственно локализованной одновоксельной спектроскопии методом STEAM (stimulated echo acquisition mode spectroscopy) с параметрами импульсной последовательности TE = 3 мс, TR = 5 с и количеством накоплений 100. Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя с помощью методики FastMap. Подавление сигнала воды в спектрах осуществлялось с помощью импульса переменной мощности и оптимизированной задержки релаксационной последовательности (VAPOR).

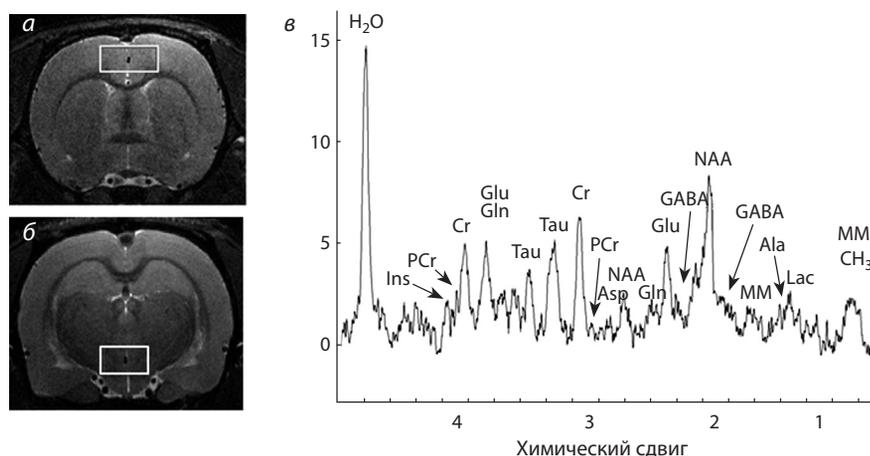


Рис. 1. Расположение вокселя для ^1H МРС коры головного мозга (а) и гипоталамуса (б).

в – типичный спектр и расшифровка названий метаболитов: Ins – мио-инозитол; PCr – фосфокреатин; Cr – креатин; Glu – глутаминовая кислота; Gln – глутамин; Tau – таурин; Asp – аспарат; NAA – N-ацетиласпарат; GABA – гамма-аминомасляная кислота; MM – макромолекулы; Ala – аланин; и Lac – лактат.

Обработка ^1H спектров. Для обработки экспериментальных спектров ^1H МРС и определения количественного состава метаболитов использовалась оригинальная разработанная специализированная компьютерная программа, основанная, 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 с соавт. (2014).

Статистика. Данные представлены как Mean \pm SE. Сравнения средних значений с контролем выполнены на основе метода наименьших значимых различий – one-way ANOVA, Post-hoc LSD-test. Число начальных переменных, характеризующее относительное количество метаболитов мозга, было уменьшено с помощью анализа Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). Корреляции осей PLS-DA с метаболитами анализировали методом Пирсона.

Результаты

Как показала протонная ЯМР спектроскопия коры головного мозга и гипоталамуса, содержание отдельных метаболитов не отличалось на статистически значимом уровне между линиями НИСАГ и Wistar (таблица). Вместе с тем были выявлены межлинейные отличия по метаболомным паттернам, для анализа которых использовали общепринятую в ЯМР-спектроскопических исследованиях многомерную статистику (Allen et al., 2013). Методом PLS DA для метаболитов коры головного мозга выделена ось Y_1 , характеризующая изменчивость сопряженных переменных (рис. 2), которая положительно коррелировала с уровнями глутамин + глутамат, мио-инозитолом, N-ацетиласпаратом и отрицательно – с уровнем глицина. У крыс линии НИСАГ значения этой оси были отрицательными, а у крыс линии Вистар – положительными.

Для метаболитов гипоталамуса выделена ось Y_1 , характеризующая изменчивость сопряженных переменных (рис. 3), которая отрицательно коррелировала с уровнями гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), лактатом и положительно – с уровнями суммы глутамин + глутамат, мио-инозитолом. У крыс линии НИСАГ значения этой оси были положительными, а у крыс линии Вистар – отрицательными.

Среднее артериальное давление положительно коррелировало со значениями оси Y_1 в гипоталамусе ($r = 0,48, p < 0,02$), и отрицательно в коре головного мозга ($r = -0,40, p < 0,05$).

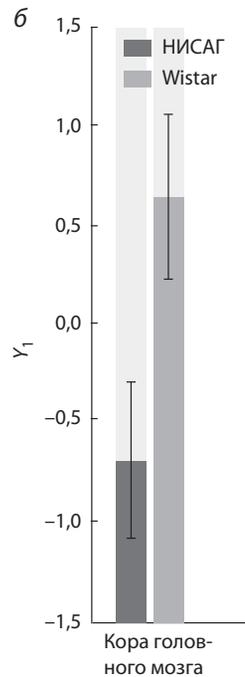
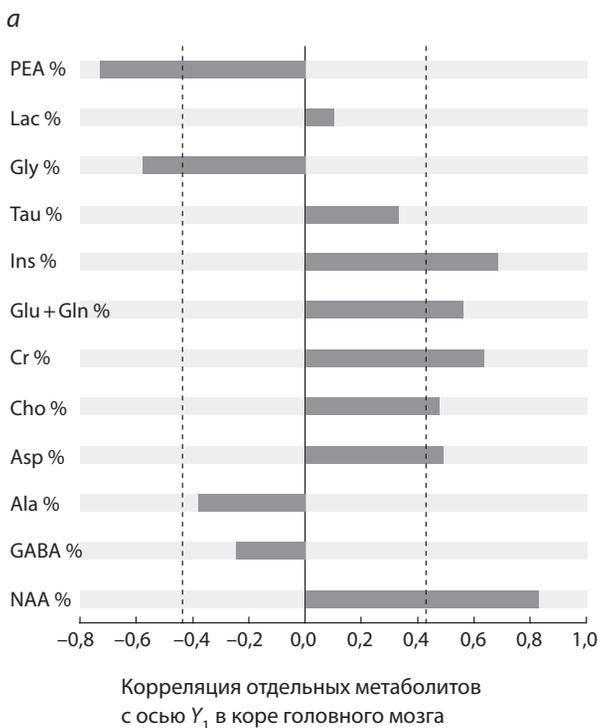
Обсуждение

Поскольку значения оси Y_1 , выявленной для коры головного мозга, положительно коррелировали с суммарным уровнем возбуждающих нейромедиаторов (глутамин + глутамат) и отрицательно с уровнем тормозного нейромедиатора (глицин), а также положительно коррелировали с уровнем маркера функции глии и нейрональной активности (мио-инозитол) (Громова и др., 2013; Tušková et al., 2015) и маркером доли нормально функционирующих нейронов (N-ацетиласпарат) (Tušková et al., 2015), то вариации данной оси можно отождествить с преобладанием возбуждающих нейромедиаторов над тормозными, а также с активностью нейронов и глии. Исходя из наших данных, возбудимость и функциональная активность нейронов и глии коры головного мозга крыс линии НИСАГ ниже, по сравнению с линией Wistar. В работе И.О. Мешкова с соавт. (2012) было показано, что в тесте открытого поля крысы линии НИСАГ демонстрировали большую исследовательскую активность, а в тесте на звуковой раздражитель – пониженную тревожность по сравнению с нормотензивной линией крыс. Результаты поведенческого тестирования хорошо соотносятся с нашими данными о пониженной возбудимости коры головного мозга у крыс линии НИСАГ.

Значения оси Y_1 , выявленной для гипоталамуса, отрицательно коррелировали с тормозным нейромедиатором (ГАМК) и положительно – с суммой возбуждающих нейромедиаторов (глутамин + глутамат); положительно коррелировали с уровнем маркера функции глии (мио-инозитол) (Громова и др., 2013; Tušková et al., 2015) и отрицательно – с маркером кислородного дефицита (лактат) (Silachev et al., 2015). Вариации этой оси можно отождествить с преобладанием возбуждающих нейромедиаторов над тормозными, а также с повышением активности глии. Следовательно, у крыс линии НИСАГ уровень нейрональной активности гипоталамуса выше, по сравнению с нормотензивными крысами. В работе Крамера с соавт. (Kramer et al., 2000) было показано, что при моделировании артериальной гипертензии возрастает

Относительные значения отдельных метаболитов (в % от суммы всех метаболитов) в коре головного мозга и гипоталамусе крыс линий НИСАГ и Вистар (*in vivo* ^1H МРС)

Генетическая линия	Кора головного мозга					
	NAA % (N-ацетил-аспартат)	GABA % (гамма-амино-масляная кислота)	Ala % (аланин)	Asp % (аспартат)	Cho % (холин)	Cr % (креатин)
НИСАГ ($n = 12$)	17,23 ± 0,65	2,91 ± 0,52	3,53 ± 0,71	0,09 ± 0,01	0,82 ± 0,15	13,78 ± 0,87
Вистар ($n = 13$)	18,78 ± 0,62	3,81 ± 0,76	2,76 ± 0,73	0,31 ± 0,20	1,10 ± 0,13	14,45 ± 1,08
	Гипоталамус					
	NAA %	GABA %	Ala %	Asp %	Cho %	Cr %
НИСАГ ($n = 12$)	12,48 ± 0,61	1,63 ± 0,39	4,44 ± 1,08	2,52 ± 0,89	1,94 ± 0,32	13,87 ± 0,94
Вистар ($n = 13$)	13,04 ± 1,03	3,52 ± 1,02	7,13 ± 1,76	1,50 ± 0,55	2,13 ± 0,34	13,89 ± 1,07
	Гипоталамус					
	Glu + Gln % (глутамин и глутамат)	Ins % (мио-инозитол)	Tau % (таурин)	Gly % (глицин)	Lac % (лактат)	PEA % (фосфорил-этанол-амин)
НИСАГ ($n = 12$)	16,09 ± 1,19	4,82 ± 1,86	4,18 ± 0,37	19,48 ± 3,13	6,37 ± 1,15	10,70 ± 1,78
Вистар ($n = 13$)	16,89 ± 1,23	7,23 ± 1,91	4,78 ± 0,49	15,47 ± 3,32	5,73 ± 1,63	8,68 ± 1,72



нейрональная активность каудальной части гипоталамуса, оцененная по электрофизиологическим критериям и по падению концентрации ГАМК.

Индивидуальные вариации среднего артериального давления коррелируют со значениями оси Y_1 , отражающей преобладание возбуждающих нейромедиаторов над тормозными. Причем для метаболитов коры головного мозга эта корреляция положительная, а для гипоталамуса – отрицательная. Разнонаправленная взаимозависимость согласуется с данными литературы о противоположном влиянии барорецепторов мозговых артерий на нейрональную активность в коре головного мозга (Rau, Elbert, 2001; Pramlea et al., 2015) и гипоталамусе (Kawabe et al., 2012).

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Магнитно-резонансная спектроскопия выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-14-00221), обработка спектров ^1H МРС проведена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00020).

Преобладание возбуждающих нейромедиаторов над тормозными, повышение активности нейронов и функции глии

Эффективность общего метаболизма и энергообмена

Рис. 2. Корреляция отдельных метаболитов со значениями оси Y_1 в коре головного мозга крыс (а); значения оси Y_1 в коре головного мозга крыс (б).

PEA – фосфорилэтанол-амин; Lac – лактат; Gly – глицин; Tau – таурин; Ins – мио-инозитол; Glu – глутаминовая кислота; Gln – глутамин; Cr – креатин; Cho – холин; Asp – аспартат; Ala – аланин; GABA – гамма-аминомасляная кислота; NAA – N-ацетиласпартат.

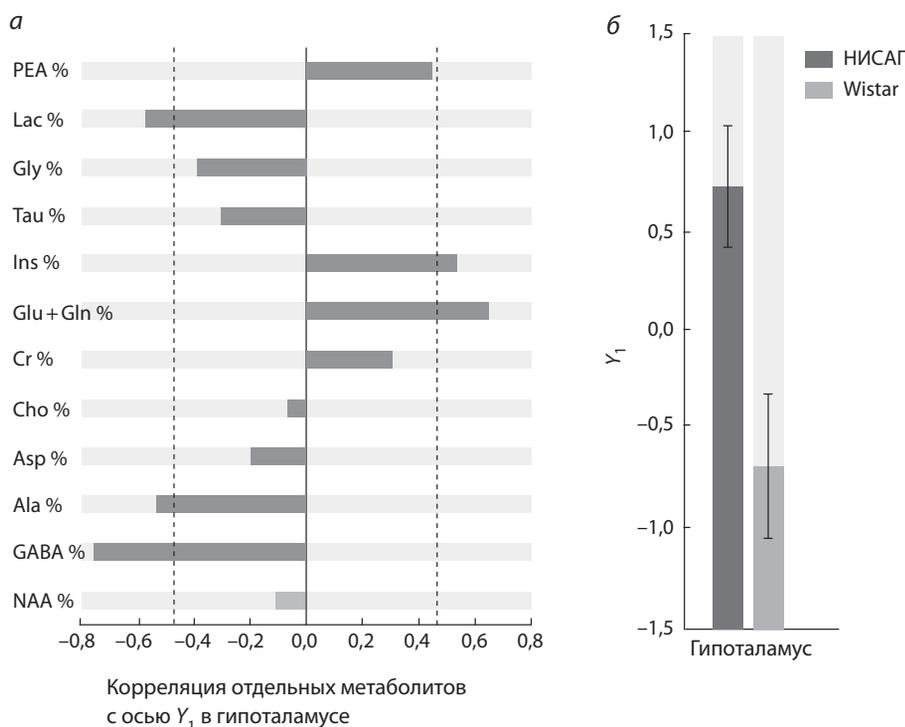


Рис. 3. Корреляция отдельных метаболитов со значениями оси Y₁ в гипоталамусе крыс (а); значения оси Y₁ в гипоталамусе крыс (б).

Расшифровку метаболитов см. в подписи к рис. 2.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Громова О.А., Торшин И.Ю., Гришина Т.Р., Громов А.Н., Лиманова О.А. Систематический анализ молекулярно-физиологических эффектов мио-инозитола: данные молекулярной биологии, экспериментальной и клинической медицины. *Акушерство и гинекология*. 2013;3:4-12.
- Мешков И.О., Алехина Т.А., Морева Т.А., Маркель А.Л. Характеристика поведения гипертензивных крыс линии НИСАГ. *Журн. высш. нервн. деят-сти*. 2012;62(2):1-10.
- Allen G.I., Peterson C., Vannucci M., Maletic-Savatić M. Regularized partial least squares with an application to NMR spectroscopy. *Stat. Anal. Data Min.* 2013;6(4):302-314.
- Ben Salem D., Walker P.M., Bejot Y., Aho S.L., Tavernier B., Rouaud O., Ricolfi F., Brunotte F. N-acetylaspartate/creatine and choline/creatine ratios in the thalami, insular cortex and white matter as markers of hypertension and cognitive impairment in the elderly. *Hypertens. Res.* 2008;31(10):1851-1857. DOI: 10.1291/hypres.31.1851
- Cao Z., Ye B.D., Shen Z.W., Cheng X.F., Yang Z.X., Liu Y.Y., Wu R.H., Geng K., Xiao Y.Y. 2D-1H proton magnetic resonance spectroscopic imaging study on brain metabolite alterations in patients with diabetic hypertension. *Mol. Med. Rep.* 2015;11(6):4232-4238. DOI: 10.3892/mmr.2015.3305
- Carnevale D., Mascio G., D'Andrea I., Fardella V., Bell R.D., Branchi I., Pallante F., Zlokovic B., Yan S.S., Lembo G. Hypertension induces brain β -amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature. *Hypertension*. 2012;60(1):188-197. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.195511
- Kawabe T., Kawabe K., Sapru H.N. Effect of barodenervation on cardiovascular responses elicited from the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. *PLoS One*. 2012;7(12):e53111. DOI: 10.1371/journal.pone.0053111
- Kayano H., Koba S., Matsui T., Fukuoka H., Kaneko K., Shoji M., Toshida T., Watanabe N., Geshi E., Kobayashi Y. Impact of depression on masked hypertension and variability in home blood pressure in treated hypertensive patients. *Hypertens. Res.* 2015. DOI: 10.1038/hr.2015.75
- Kramer J.M., Plowey E.D., Beatty J.A., Little H.R., Waldrop T.G. Hypothalamus, hypertension, and exercise. *Brain Res. Bull.* 2000;53(1): 77-85.
- Markel A. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Genet. Hypertension*. 1992;218:405-407.
- Moshkin M.P., Akulov A.E., Petrovski D.V., Saik O.V., Petrovskiy E.D., Savelov A.A., Koptyug I.V. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D-glucose and lipopolysaccharides. *NMR Biomed.* 2014;27: 399-405. DOI: 10.1002/nbm.3074
- Prammea L., Schächinger H., Fringsa C. Baroreceptor activity impacts upon controlled but not automatic distractor processing. *Biol. Psychol.* 2015;pii: S0301-0511(15)30011-9. DOI: 10.1016/j.biopsycho. 2015.06.006
- Provencher S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 1993;30(6):672-679.
- Rau H., Elbert T. Psychophysiology of arterial baroreceptors and the etiology of hypertension. *Biol. Psychol.* 2001;57(1-3):179-201.
- Silachev D.N., Gulyaev M.V., Zorova L.D., Khailova L.S., Gubsky L.V., Pirogov Y.A., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Zorov D.B. Magnetic resonance spectroscopy of the ischemic brain under lithium treatment. Link to mitochondrial disorders under stroke. *Chem. Biol. Interact.* 2015;237:175-182. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.06.012
- Tušková R., Lipták B., Szomolányi P., Vančová O., Uličná O., Sumbalová Z., Kucharová J., Dubovický M., Trattig S., Liptaj T., Kašparová S. Neuronal marker recovery after Simvastatin treatment in dementia in the rat brain: *in vivo* magnetic resonance study. *Behav. Brain Res.* 2015;284:257-264. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.02.016

Магнитно-резонансная спектроскопия нейрометаболитов в гиппокампе у агрессивных и ручных самцов крыс

Р.Г. Гулевич, А.Е. Акулов, С.Г. Шихевич, Р.В. Кожемякина, И.З. Плюснина

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

Методом ^1H магнитно-резонансной спектроскопии исследовали спектр основных метаболитов в дорзальной области гиппокампа у взрослых самцов крыс после длительного отбора на усиление и отсутствие агрессивно-оборонительных реакций по отношению к человеку, а также у неселекционируемых крыс, разводимых в условиях вивария. Показано, что у ручных и неселекционированных самцов проценты всех исследуемых нейрометаболитов (от общего количества) достоверно не отличаются, тогда как по отдельным метаболитам найдены различия между агрессивными и ручными или между агрессивными и неселекционированными животными. У ручных самцов процент ГАМК, N-ацетиласпартата и компонентов, содержащих холин, выше, а фосфорилэтанолamina, наоборот, ниже, чем у агрессивных. Возможно, у ручных крыс из-за повышенного содержания ГАМК, одного из основных тормозных нейромедиаторов мозга, понижена интенсивность процесса возбуждения, в отличие от агрессивных. У агрессивных животных процент глутаминa, аспартата, фосфорилэтанолamina и лактата выше, а NAA и креатинина с фосфокреатинином, наоборот, ниже, чем у неселекционированных. Повышенный процент аспартата, одного из основных транзиттеров возбуждения в мозге, у агрессивных крыс также может способствовать более интенсивному процессу возбуждения, по сравнению с неселекционированными, в то время как более высокий уровень глутаминa у крыс с агрессивным поведением относительно неселекционированных может быть показателем метаболического нарушения в цикле глутамат – глутамин, связывающем нейрональные и глиальные клетки, а также понижения активности глутаминазы, расщепляющей глутамин до глутаминовой кислоты (предшественника ГАМК) и аммиака. Понижение процента NAA наряду с повышением процента глутаминa у агрессивных крыс может свидетельствовать об ухудшении энергетического метаболизма относительно неселекционированных животных. Найденные различия по содержанию нейрометаболитов в гиппокампе у неселекционированных и длительно селекционированных на агрессивное поведение крыс позволяют предполагать существование различных нейробиологических механизмов проявления агрессивности у этих животных.

Ключевые слова: ^1H магнитно-резонансная спектроскопия; агрессия; крысы; ГАМК; гиппокамп; N-ацетиласпартат; селекция.

Proton magnetic resonance spectroscopy of neurometabolites in the hippocampi of aggressive and tame male rats

R.G. Gulevich, A.E. Akulov, S.G. Shikhevich, R.V. Kozhemyakina, I.Z. Plyusnina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Proportions of major neurometabolites with regard to their total amount in the dorsal region of hippocampus were studied in adult male rats of populations selected for long for increase and absence of aggressive-fearful response to humans and in unselected vivarium-kept rats by ^1H magnetic resonance spectrometry. Tame and unselected males showed no significant differences in the proportions of any neurometabolites studied. Differences in the proportions of some neurometabolites were found in aggressive vs. tame and in aggressive vs. unselected animals. Tame animals showed higher proportions of GABA, N-acetylaspartate (NAA), and choline derivatives and a lower proportion of phosphorylethanolamine than aggressive ones. It is likely that the elevated content of GABA, one of the main inhibitory neurotransmitters in the brain, lowers excitation intensity in tame pups in comparison to aggressive ones. In comparison to unselected animals, aggressive rats demonstrated higher proportions of glutamine, aspartate, phosphorylethanolamine, and lactate and lower proportions of NAA and creatinine + phosphocreatinine. Aspartate is one of the main excitement transmitter, and its elevated proportion in the brain of aggressive rats may favor more intense excitation than in unselected rats. In contrast, the elevated proportion of glutamine in aggressive rats vs. tame rats may be indicative of (1) a metabolic disturbance in the glutamate – glutamine cycle, which links neural and glial cells, and (2) decrease in the activity of glutaminase, the enzyme converting glutamine to glutamate (GABA precursor). The reduced NAA proportion together with the elevated proportion of glutamine in aggressive rats point to impaired energy metabolism in comparison to unselected animals. The differences in neurometabolite patterns between hippocampi of male rats of the unselected and aggressive populations suggest the existence

of different neurobiological mechanisms governing aggression manifestation.

Key words: proton magnetic resonance spectroscopy; aggression; rats; GABA; hippocampus; N-acetylaspartate; selection.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Гулевич Р.Г., Акулов А.Е., Шихевич С.Г., Кожемякина Р.В., Плюснина И.З. Магнитно-резонансная спектроскопия нейрометаболитов в гиппокампе у агрессивных и ручных самцов крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):432-438. DOI 10.18699/VJ15.057

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Gulevich R.G., Akulov A.E., Shikhevich S.G., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.Z. Proton magnetic resonance spectroscopy of neurometabolites in the hippocampi of aggressive and tame male rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):432-438. DOI 10.18699/VJ15.057

Известно, что комплекс миндалина–гиппокамп участвует в процессе переработки раздражителей и особенно тех, которые содержат негативные эмоции, например, такие как страх и угроза (Yang et al., 2008). У антисоциальных индивидуумов функциональные нарушения в этом районе мозга могут быть связаны с ухудшением эмоционального состояния (Raine, Yang, 2006). Показано участие комплекса миндалина–гиппокамп в регуляции агрессивного поведения (Gregg, Siegel, 2001). Кроме того, гиппокамп служит важным гомеостатическим регулятором гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), осуществляющим отрицательную связь через минералокортикоидные и глюкокортикоидные рецепторы (Wintermantel et al., 2005).

В последнее время появляются новые данные о молекулярных механизмах, которые позволяют предполагать участие гиппокампа в торможении агрессии (Kohl et al., 2013). Так, повышение в дорзальном гиппокампе крыс экспрессии нейрוליгина 2 (nlgn2), молекул клеточной адгезии, локализованных в постсинаптической мембране ингибиторных ГАМКергических синапсов и опосредующих их формирование и функционирование, вызывает ослабление агрессивности и повышение в нейрональных терминалях количества мРНК гена *GAD65*, кодирующего глутаматдекарбоксилазу (Kohl et al., 2013). Этот фермент, в свою очередь, участвует в синтезе гамма-амино-масляной кислоты (ГАМК), одного из основных тормозных нейромедиаторов мозга. Авторы считают, что нейрוליгин 2 в гиппокампе поддерживает баланс между процессами возбуждения–торможения в мозге, а также в модуляции социального и эмоционального поведения.

С помощью метода магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) оценивают широкий спектр нейрометаболитов в различных отделах мозга в норме и патологии у человека (Хоружик, 2007; Suzuki et al., 2010), а также до и после применяемой терапии (Huang et al., 2010). Например, при аутизме отмечают не только повышение холина и креатинина+фосфокреатинина (Кр+ФКр) в гиппокампе по сравнению с контролем, но и положительную корреляцию между их концентрациями и баллами агрессии, оцениваемыми по специальному опроснику (Suzuki et al., 2010). Наряду с этими работами, исследования на модельных животных более перспективны для понимания нейробиологических механизмов формирования поведения.

В ИЦиГ СО РАН в течение многих лет проводится эксперимент по селекции серых крыс на отсутствие и усиление агрессивно-оборонительной реакции на человека

или, соответственно, на ручное и агрессивное поведение (Plyusnina, Oskina, 1997). Показано, что отбор сопровождается изменением широкого спектра физиологических и поведенческих параметров (Naumenko et al., 1989; Оськина и др., 2008; Albert et al., 2008). У ручных животных, в частности, отмечали понижение функциональной активности ГГНС на фоне повышения экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора в гиппокампе (Гербек и др., 2010), а также ослабление внутривидовой агрессии, наблюдаемое в тесте «резидент–интродер» по сравнению с агрессивными и неселекционируемыми (Плюснина, Соловьева, 2010; Plyusnina et al., 2011). Можно было предполагать, что длительный отбор серых крыс по поведению в двух направлениях будет вызывать изменения в содержании некоторых нейрометаболитов в гиппокампе.

Целью данной работы было исследование влияния отбора по поведению на основные нейрометаболиты в гиппокампе у взрослых ручных, агрессивных и неселекционированных крыс.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Исследования проводили на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на трехмесячных самцах серых крыс (*Rattus norvegicus*) из двух уникальных популяций, селекционируемых в Институте цитологии и генетики СО РАН в течение 78 поколений на усиление (агрессивные) или на отсутствие (ручные) агрессивно-оборонительных реакций по отношению к человеку. Критерием отбора служили условные единицы (баллы) поведенческой реакции на руку человека в перчатке (рис. 1). В качестве контрольных, неселекционируемых, животных использовали диких крыс, которых разводили в условиях вивария в течение 7–8 поколений. Животных содержали в стандартных клетках (50×40×30 см) по 4 самца в условиях естественного фотопериода и свободного доступа к воде и пище.

Магнитно-резонансная спектроскопия дорзальной области гиппокампа

Измерения проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). За 15 мин до проведения процедуры крыс наркотизировали внутривенным введением 10 % тиопентала (0,1 мл на 100 г веса тела).

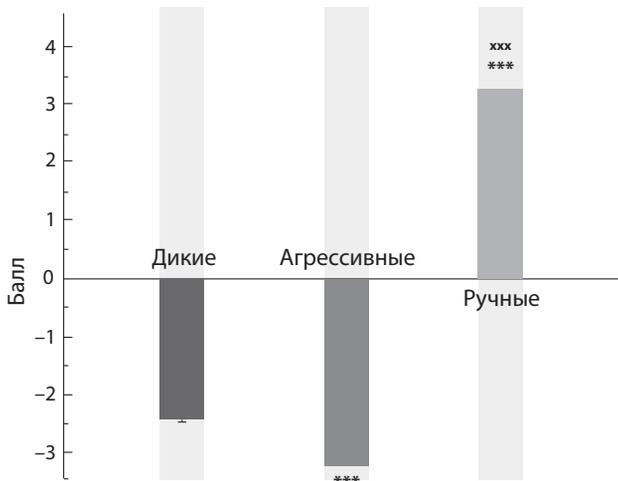


Рис. 1. Средние баллы поведенческой реакции у неселекционируемых, ручных и агрессивных крыс в тесте «на перчатку». *** $p < 0,001$ по сравнению с дикими; xxx $p < 0,001$ по сравнению с агрессивными животными.

Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей, размер которых составлял $2 \times 3 \times 2,5$ мм, были использованы изображения МРТ этих животных. Исследуемая область гиппокампа показана на рис. 2. Все протонные спектры получены с помощью одновоксельной спектроскопии методом STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode Spectroscopy). Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя с помощью методики FastMap. Для обработки экспериментальных спектров МРС была разработана специализированная компьютерная программа. Принцип работы программы подробно описан в статье М.П. Мошкина с соавт. (Moshkin et al., 2014). Полученные спектры содержали пики следующих соединений: мио-инозитол, Кр+ФКр, глутамат, глутамин, таурин, холиновые компоненты, аспаргат, N-ацетиласпаргат (НАА), ГАМК, лактат, аланин, фосфорилэтанолламин. Оценивали содержание (у.е.) и процент этих метаболитов от их общего количества. В каждой группе было по 8 самцов крыс.

Статистическая обработка

Все значения исследуемых параметров представлены в виде средних и ошибок средних ($M \pm m$). Влияние генотипа на введенные характеристики тестируемых особей определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверность различий между группами тестируемых животных оценивали с помощью post hoc-тестов (Fisher LSD).

Результаты

Обнаружено влияние популяционной принадлежности животного на относительное содержание 6 из 12 исследуемых нейрометаболитов в дорзальном гиппокампе: НАА $F_{2,21} = 6,45, p < 0,01$; ГАМК $F_{2,21} = 3,80, p < 0,05$; аспартата $F_{2,21} = 4,60, p < 0,05$; Кр+ФКр $F_{2,43} = 5,75, p < 0,05$;

глутамин $F_{2,21} = 4,01, p < 0,05$ и фосфорилэтанолламина $F_{2,21} = 5,10, p < 0,05$ (рис. 3). При этом процент аланина, холина, глутамата, мио-инозитола, таурина, лактата, а также глутамата и глутамин был статистически одинаковым у крыс из разных селекционных групп (популяций).

Следует отметить, что содержание всех исследуемых нейрометаболитов достоверно не отличается у ручных и неселекционированных самцов, тогда как отмечаются различия у агрессивных и ручных самцов по НАА, ГАМК, фосфорилэтанолламину и компонентам, содержащим холин, а также у агрессивных и неселекционированных по НАА, аспартату, Кр+ФКр, глутамину, фосфорилэтанолламину и лактату (рис. 3). У агрессивных крыс отмечается более низкий процент ГАМК, НАА и содержащих холин компонентов, но более высокий процент фосфорилэтанолламина по сравнению с ручными ($p < 0,05$). Для агрессивных самцов характерны максимальные значения глутамин, которые достоверно превосходят соответствующие показатели у неселекционированных крыс ($p < 0,05$), хотя процент НАА в гиппокампе у агрессивных самцов ниже, чем у неселекционированных ($p < 0,01$), тогда как по содержанию аспартата (предшественнику НАА), наоборот, агрессивные самцы превосходят неселекционированных ($p < 0,05$). Процент Кр+ФКр у агрессивных самцов ниже, а фосфорилэтанолламина выше, чем у неселекционированных ($p < 0,01, p < 0,05$ соответственно). Процент лактата у агрессивных крыс выше, чем у неселекционированных ($p < 0,05$).

Обсуждение

Из полученных данных следует, что в гиппокампе у агрессивных крыс понижено содержание одного из основных тормозных нейромедиаторов мозга – ГАМК, по сравнению с ручными. Ранее было показано, что с помощью фармакологических препаратов, влияющих на ГАМК-систему, можно изменять агрессивное поведение у мышей (Fish et al., 2002) и человека (Lievig et al., 2008). Согласно недавно опубликованным данным, повышение экспрессии нейролигана 2 в дорзальном гиппокампе самцов крыс линии Wistar, о котором уже упоминалось, вызывало повышение в нем количества мРНК гена *GAD65*, кодирующего глутаматдекарбоксилазу, участвующую в синтезе ГАМК, что сочеталось с ослаблением агрессивности (Kohl et al., 2013). В связи с этим возможна зависимость между процессом синтеза ГАМК и агрессивностью, что согласуется с полученными нами данными. По мнению авторов вышеприведенного исследования, нейролигин 2 в гиппокампе участвует в поддержании баланса между процессами возбуждения и торможения в мозге (Kohl et al., 2013). По-видимому, у агрессивных крыс в балансе этих процессов преобладает возбуждение из-за пониженного уровня ГАМК в гиппокампе, по сравнению с ручными.

Вместе с тем наши коллеги из Германии с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии не нашли достоверных различий в концентрации ГАМК в гиппокампе у ручных и агрессивных крыс (Albert et al., 2008). В обоих исследованиях измеряли суммарное содержание ГАМК в синапсах и нейронах, а несогласованность результатов может объясняться особенностями используемых методов измерения. МРС позволяет регистрировать

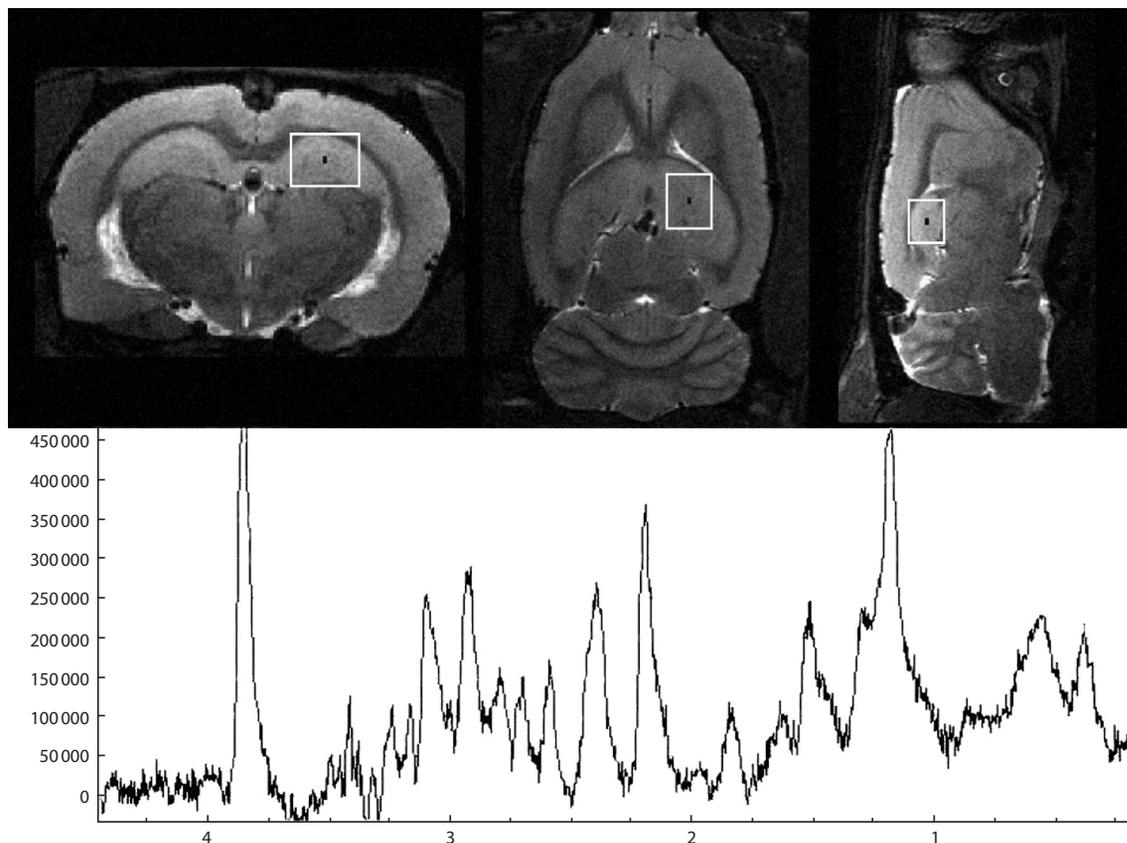


Рис. 2. Область регистрации спектров нейрометаболитов в гиппокампе крыс (верхний ряд представлен тремя ортогональными плоскостями головного мозга) и пример ^1H спектра (нижний ряд).

прижизненное содержание с предварительным введением снотворного тиопентала, тогда как методом высокоэффективной жидкостной хроматографии результаты получают после анестезии с CO_2 , цервикальной дислокации, хранения образцов тканей на -80°C , их последующей гомогенизации и экстракции ГАМК из образцов тканей. Кроме того, МРС проводили не по всему гиппокампу, а только по его дорзальной области, не касаясь темпоральной (рис. 2), тогда как для хроматографии брали весь объем гиппокампа (области CA1–CA3 и зубчатой извилины). Остается неисследованным вопрос об однородности распределения метаболитов по разным районам гиппокампа. Хотя, как было показано на грызунах, септальный и темпоральный районы не только имеют разное функциональное значение (Tanti, Belzung, 2013), но и отличаются по интенсивности нейрогенеза: в темпоральном районе количество профилирующих клеток и молодых нейронов меньше, чем в септальном (Jinno, 2011).

Если процент ГАМК в гиппокампе у агрессивных самцов ниже, чем у ручных самцов, то по аспартату агрессивные превосходят и ручных (на уровне тенденции), и неселекционированных животных ($p < 0,05$, рис. 3). Поскольку аспартат считают одним из основных транмиттеров возбуждения в мозге (Dingledine, McBain, 1999), то можно думать, что повышенный процент его в гиппокампе у агрессивных крыс также способствует

более интенсивному процессу возбуждения, чем у неселекционированных и ручных.

У агрессивных крыс отмечали более высокий процент глутамина, чем у неселекционированных ($p < 0,05$) и ручных. Известно, что глутамин синтезируется в глиальных клетках, затем транспортируется в нервные окончания и трансформируется в глутамат (Govindaraju et al., 2000). У трансгенных мышей с болезнью Хантингтона наряду с понижением NAA в мозге также отмечали повышение глутамина, что может свидетельствовать о метаболических нарушениях в цикле глутамат–глутамин, связывающем нейрональные и глиальные клетки, а также о понижении активности глутамины, расщепляющей глутамин до глутаминовой кислоты (предшественника ГАМК) и аммиака (Jenkins et al., 2000). Возможно, по этим же причинам повышен процент глутамина в гиппокампе у самцов крыс с агрессивным поведением по сравнению с неселекционированными.

В гиппокампе у агрессивных крыс отмечали понижение содержания NAA, по сравнению с ручными и неселекционированными. Этот метаболит считается маркером нейронального здоровья, поскольку понижение его уровня сопутствует старению, а также дисфункции и гибели нейронов в случае некоторых заболеваний или повреждений головного мозга (Moffett et al., 2007; Oberg et al., 2008). У пациентов с неоднократным проявлением

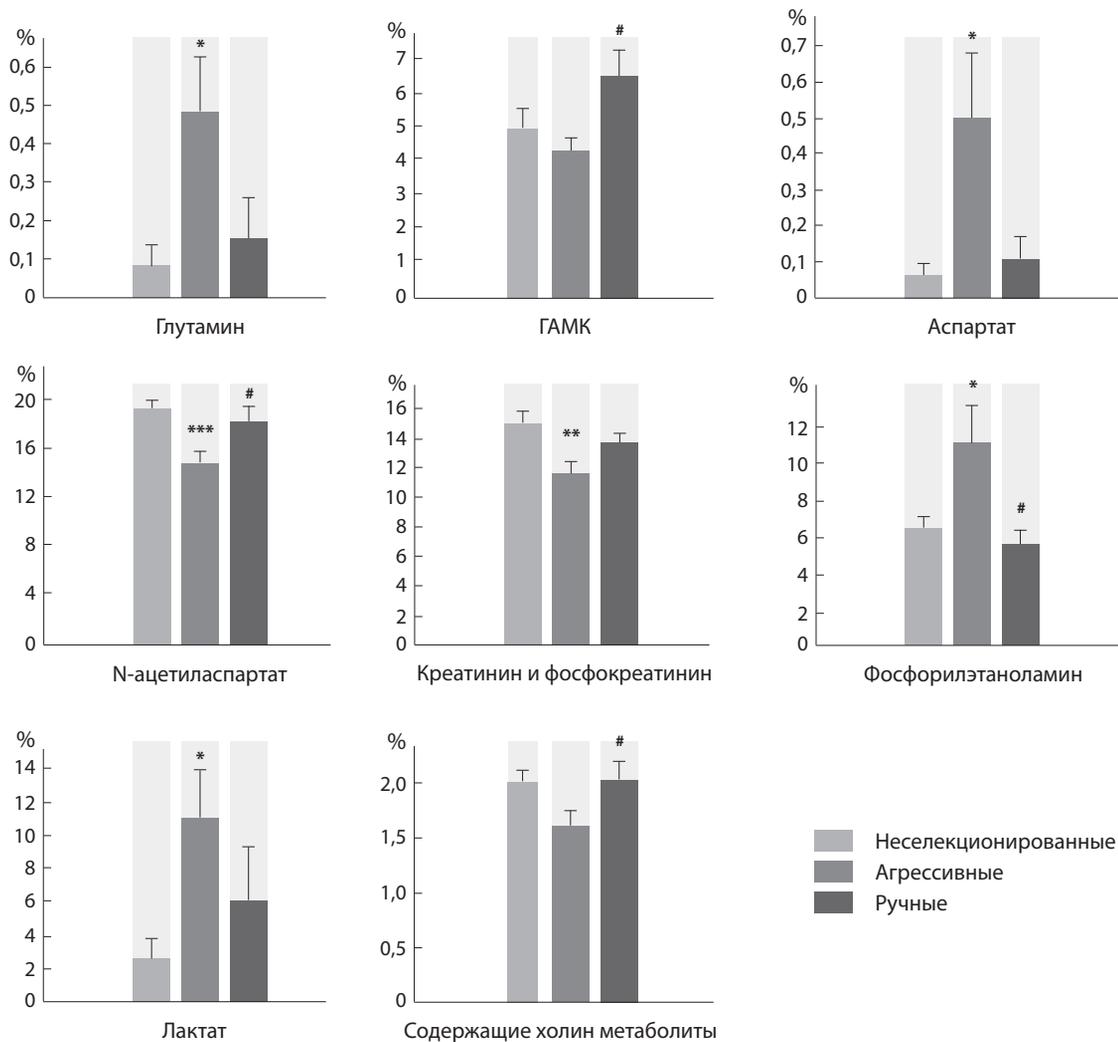


Рис. 3. Содержание основных нейрометаболитов в гиппокампе у крыс, селекционированных по поведению (в % от общего количества). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с неселекционированными; # $p < 0,05$ по сравнению с агрессивными.

жестокости методом ^1H МРС было показано понижение концентрации NAA и Кр+ФКр в префронтальной коре, а также отношения NAA/Кр+ФКр в миндалино-гиппокампальном комплексе, по сравнению с контрольными субъектами (Critchley et al., 2000). Причем между концентрацией NAA в префронтальной коре и частотой агрессивных проявлений отмечали достоверную корреляцию. Авторы полагают, что наблюдаемые изменения в исследуемых областях мозга у пациентов могут быть вызваны понижением плотности нейронов и нарушением регуляции фосфатного метаболизма. Возможно, это относится и к гиппокампу агрессивных крыс, у которых также отмечали пониженный процент NAA и Кр+ФКр относительно ручных и неселекционированных, хотя отношение NAA/Кр+ФКр в гиппокампе у крыс разного поведения не различалось.

В то же время в гиппокампе у субъектов с аутизмом, агрессивность которых оценивали по специальному вопросу, концентрации Кр+ФКр, а также холина были выше, чем у контрольных субъектов (Suzuki et al., 2010).

Поскольку холин входит в состав клеточных мембран и является компонентом фосфолипидного метаболизма, по его уровню судят о синтезе мембран и пролиферации клеток (Хоружик, 2007). Из полученных нами данных в гиппокампе у агрессивных крыс, наоборот, процент Кр+ФКр, и холина ниже, чем у неселекционируемых. В связи с этим можно предполагать существование различных нейробиологических механизмов проявления агрессивности или их видовых особенностей.

О смещенном фосфатном метаболизме в гиппокампе у агрессивных самцов свидетельствуют полученные нами данные по проценту фосфорилэтанолламина и Кр+ФКр, а также содержащих холин метаболитов, компонентов фосфолипидного метаболизма и клеточных мембран. Если проценты Кр+ФКр и содержащих холин компонентов минимальны у агрессивных животных по сравнению с ручными и неселекционированными, то процент фосфорилэтанолламина, наоборот, у первых максимальный.

У пациентов со спонтанными паническими приступами было показано, что визуальная стимуляция вызывает

более сильное повышение лактата/NAA в коре мозга, чем у контроля, что, по мнению авторов, может влиять на регуляцию системы возбуждения (Maddock et al., 2009). Другие исследователи у таких же пациентов отмечали однонаправленные изменения метаболитов в разных структурах мозга, а именно пониженный уровень ГАМК и повышенные уровни лактата и холина как в передней извилине коры, так и в базальных ганглиях, что может иметь существенное значение для патофизиологии этого заболевания (Ham et al., 2007). В гиппокампе у агрессивных крыс также обнаружено понижение уровня ГАМК по сравнению с ручными и повышение уровня лактата по сравнению с неселекционированными. Возможно, такие изменения характерны не только для гиппокампа и способны вызывать паническое поведение у агрессивных крыс, наблюдаемое, в частности, при тестировании «на перчатку» и в тесте Морриса, в отличие от ручных (Plyusnina et al., 2008). Более высокий уровень лактата в гиппокампе у агрессивных самцов, по сравнению с неселекционированными, может свидетельствовать о различиях в энергетическом метаболизме и регуляции возбуждения.

Известно, что существует связь между синтезом NAA в митохондриях нейронов и метаболизмом гликогена и глюкозы – основного источника энергии в мозге (Moreno et al., 2001), а также энергетическим метаболизмом, который ухудшается при понижении NAA (Signoretto et al., 2004). Подавление метаболизма глюкозы может вызывать в гиппокампе у мышей понижение не только NAA, но и ГАМК, содержащих холин метаболитов, а также повышение глутамина и глутамата (Moshkin et al., 2014). У агрессивных крыс также отмечается понижение NAA, ГАМК и повышение глутамата по сравнению с ручными и неселекционированными, поэтому можно думать, что при отборе на агрессивное поведение ухудшается энергетический метаболизм в гиппокампе. Такое предположение согласуется с данными, недавно полученными на пчелах и дрозофилах (Li-Buyarlay et al., 2014). Из них следует, что агрессия насекомых напрямую зависит от понижения энергетического метаболизма в нейронах мозга в результате подавления активности генов, связанных с процессом окислительного фосфорилирования, при ингибировании которого агрессивность усиливается, хотя первоначально авторами предполагалось, что для агрессии, наоборот, требуется больше энергии.

К тому же у агрессивных крыс повышено содержание лактата, выполняющего роль энергетического топлива, которое поставляется нейронам, для того чтобы поддерживать их работу в случае повышения активности мозга (Tang, 2014). Концентрация лактата в интерстиции зависит как от гликолитической продукции в астроцитах, так и от митохондриального потребления в нейронах (Barros, 2013). Согласно нейро-энергетической теории, синдром дефицита внимания/гиперактивности обусловлен энергетической недостаточностью вследствие нарушенного обеспечения нейронов лактатом (Killeen et al., 2013). С терапевтической целью предлагается с помощью норэпинефрина активировать глиальные адренорецепторы в активной области мозга, чтобы увеличить выброс лактата из астроцитов. В исследовании генетических основ антисоциального

поведения у пациентов с синдромом дефицита внимания найдена ассоциация между повышенной агрессивностью и геном катехол-О-метилтрансферазы (COMT), цитозольного фермента, катализирующего присоединение метильных групп к различным катехоламинам (Monuteaux et al., 2009; Hamshere et al., 2013). У детей с сопутствующей агрессией повышен риск синдрома дефицита внимания (Hamshere et al., 2013). Поскольку у агрессивных крыс концентрация лактата в гиппокампе повышена, по сравнению с ручными и неселекционированными, можно предполагать, что лактат у них медленнее поступает из астроцитов или хуже метаболизируется в нейронах, влияя на их энергетическую обеспеченность.

Таким образом, при длительном отборе крыс по поведению в двух направлениях отмечаются различия по содержанию ГАМК, NAA, фосфорилэтанолamina и содержащих холин компонентов в гиппокампе. Относительно неселекционированных крыс изменения в спектре метаболитов касаются только агрессивных животных: процент глутамата, аспартата и лактата у последних выше, а Кр + ФКр ниже, чем у контрольных.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.4.

Магнитно-резонансная спектроскопия выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-45-00040); обработка данных при помощи Matlab, Inc проведена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-00221); селекция и сохранение использованных в исследовании линий крыс проведены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 11-04-00653-а.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Гербек Ю.Э., Оськина И.Н., Гулевич Р.Г., Плюснина И.З. Влияние материнской метилобогатой диеты на экспрессию гена рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе у крыс селектуемых по поведению. Цитол. и генет. 2010;44(2):45-52.
- Оськина И.Н., Гербек Ю.Э., Шихевич С.Г., Плюснина И.З., Гулевич Р.Г. Изменения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем при отборе животных на доместикационное поведение. Информационный вестник ВОГиС. 2008;12(1/2): 39-49.
- Плюснина И.З., Соловьева М.Ю. Внутривидовая межсамцовая агрессия у ручных и агрессивных серых крыс. Журн. высш. нервн. деят-сти им. И.П. Павлова. 2010;60(2):175-183.
- Хоружик С.А. Магнитно-резонансная спектроскопия при опухолях головного мозга. Онкол. журн. 2007;3:51-62.
- Albert F.W., Shchepina O., Winter C., Römpler H., Teupser D., Palme R., Ceglarek U., Kratzsch J., Sohr R., Trut L.N., Thiery J., Morgenstern R., Plyusnina I.Z., Schöneberg T., Pääbo S. Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans. *Horm. Behav.* 2008;5:413-421.
- Barros L.F. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci.* 2013;36(7):396-404. DOI: 10.1016/j.tins.2013.04.002
- Critchley H., Simmons A., Daly E., Russel A., van Amelsvoort T., Robertson D., Glover A., Murphy D. Prefrontal and medial temporal correlates of repetitive violence to self and other. *Biol. Psychiat.*

- 2000;47:928-934.
- Dingledine R., McBain C. Glutamate and Aspartate are Major Excitatory Transmitters in the Brain. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Ed. G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher, M.D. Uhler. Philadelphia. 1999.
- Fish E.W., De Bold J.F., Miczek K.A. Aggressive behavior as a reinforcer in mice: activation by allopregnalone. *Psychopharmacology*. 2002;13(3/4):459-466.
- Govindaraju V., Young K., Maudsley A.A. Proton NMR chemical shifts and coupling constant for brain metabolites. *NMR Biomed*. 2000;13:129-153.
- Gregg T.R., Siegel A. Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: implications for human aggression. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 2001;25(1):91-140.
- Ham B., Sung Y., Kim N., Kim S., Kim J., Kim D., Lee J., Kim J., Yoon S., Lyoo I. Decreased GABA levels in anterior cingulate and basal ganglia in medicated subjects with panic disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) study. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 2007;31(2):403-411.
- Hamshere M., Stergiakouli E., Langley K., Martin J., Holmans P., Kent L., Owen M., Gill M., Thapar A., O'Donovan M., Craddock N. Shared polygenic contribution between childhood attention-deficit hyperactivity disorder and adult schizophrenia. *Brit. J. Psychiat.* 2013;203(2):107-111. DOI: 10.1192/bjp.bp.112.117432
- Huang Y., Chen W., Li Y., Wu X., Shi X., Geng D. Effect of antidepressant treatment on N-acetyl aspartate and choline levels in the hippocampus and thalamus of post-stroke depression patients: A study using ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Psychiat. Res.: Neuroimaging*. 2010;182:48-52. DOI: 10.1016/j.psychres.2009.11.009
- Jenkins B., Klivenyi P., Kustermann E., Andreassen O., Ferrante R., Rosen B., Beal M. Nonlinear decrease over time in N-acetyl aspartate levels in the absence of neuronal loss and increases in glutamine and glucose in transgenic Huntington's disease mice. *J. Neurochem*. 2000;74(5):2108-2119. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0742108.x
- Jinno S. Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: a stereology-based study using endogenous markers. *Hippocampus*. 2011;21(5):467-480. DOI: 10.1002/hipo.20762
- Killeen P., Russel V., Sergeant J. A behavioral neuroenergetics theory of ADHD. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2013;37(4):625-657. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2013.02.011
- Kohl C., Riccio O., Grosse J., Zanolletti O., Fournier C., Schmidt M.V., Sandi C. Hippocampal neuroligin-2 overexpression leads to reduced aggression and inhibited novelty reactivity in rats. *PLoS One*. 2013;8(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0056871
- Li-Byarlay H., Rittschof C., Massey J., Pittendrigh B., Robinson G. Socially responsive effects of brain oxidative metabolism on aggression. *PNAS*. 2014;111(34):12533-12537. DOI: 10.1073/pnas.1412306111
- Lieving L.V., Cherek D.R., Lane S.D., Tcheremissine O.V., Nouvion S.O. Effect of acute tiagabine administration on aggressive responses of adult male parolees. *J. Psychopharmacol.* 2008;22(2):144-152.
- Maddock R., Buonocore M., Copeland L., Richards A. Elevated brain lactate responses to neural activation in panic disorder: a dynamic ¹H MRS study. *Mol. Psychiat.* 2009;14:537-545. DOI: 10.1038/sj.mp.4002137
- Moffett J., Ross B., Arun P., Madhavarao C., Nambodiri A. N-acetyl aspartate in the CNS: from neurodiagnostic to neurobiology. *Progr. Neurobiol.* 2007;81(2):89-131.
- Monuteaux M., Biederman J., Doyle A., Mick E., Faraone S. Genetic risk for conduct disorder symptom subtypes in an ADHD sample: specificity to aggressive symptoms. *J. Am. Acad. Child Adolescent Psychiat.* 2009;48(7):757-764. DOI: 10.1097/CHI.0b013e3181a5661b
- Moreno A., Ross B., Blum S. Direct determination of the N-acetyl-L-aspartate synthesis rate in the human brain by ¹³C MRS and [¹³C]glucose infusion. *J. Neurochem*. 2001;27(1):347-350. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00282.x
- Moshkin M.P., Akulov A.E., Petrovski D.V., Saik O.V., Petrovskiy E.D., Savelov A.A., Koptuyug I.V. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D-glucose and lipopolysaccharides. *NMR Biomed*. 2014;27(4):399-405. DOI: 10.1002/nbm.3074
- Naumenko E.V., Popova N.K., Nikulina E.M., Dygalo N.N., Shishkina G.T., Borodin P.M., Markel A.L. Behavior, adrenocortical activity, and brain monoamines in Norway rats selected for reduced aggressiveness towards man. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989;33:85-91.
- Oberg J., Spenger C., Wang F., Andersson A., Westman E., Scoglund P., Sunnemark D., Norinder U., Klason T., Wahlund L., Lindberg M. Age related changes in brain metabolites observed by ¹H MRS in APP/PS1 mice. *Neurobiol. Aging*. 2008;29(9):1423-1433.
- Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Physiol. Behav.* 1997;61(3):381-385.
- Plyusnina I.Z., Shchepina O., Oskina I., Trut L. Some features of learning in the Morris water test in rats selected for responses to humans. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2008;38(5):511-516. DOI: 10.1007/s11055-008-9010-9
- Plyusnina I.Z., Solov'eva M.Yu., Oskina I.N. Effect of domestication on aggression in gray rats. *Behav. Genet.* 2011;41(4):583-592.
- Raine A., Yang Y. Neural foundations to moral reasoning and antisocial behavior. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 2006;1(3):203-213.
- Signoretti S., Marmarou A., Tavazzi B., Dunbar J., Amorini A., Lazarino G., Vagnozzi R. The protective effect of cyclosporin upon N-acetyl aspartate and mitochondrial dysfunction following experimental diffuse traumatic brain injury. *J. Neurotraum.* 2004;21(9):1154-1167. DOI: 10.1089/neu.2004.21.1154
- Suzuki K., Nishimura K., Sugihara G., Nakamura K., Tsuchiya K.J., Matsumoto K., Takebayashi K., Isoda H., Sakahara H., Sugiyama T., Tsujii M., Takei N., Mori N. Metabolite alterations in the hippocampus of high-functioning adult subject with autism. *Intern. J. Neuropsychopharmacol.* 2010;13:529-534. DOI: 10.1017/S1461145709990952
- Tang F., Lane S., Korsak A., Paton J., Gourine A., Kasparov S., Teschemacher A. Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat. Communications*. 2014;5(3284). DOI: 10.1038/ncomms4284
- Tanti A., Belzung C. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neurosci.* 2013;12(252):234-252.
- Veenema A.H., de Kloet E.R., de Wilde M.C., Roelofs A.J., Kawata M., Buwalda B., Neumann I.D., Koolhaas J.M., Lucassen P.J. Differential effects of stress on adult hippocampal cell proliferation in low and high aggressive mice. *J. Neuroendocrinol.* 2007;19:489-498. DOI: 10.1111/J.1365-2826.2007.01555.x
- Wintermantel T.M., Berger S., Greiner E.F., Schultz G. Evaluation of steroid receptor function by gene targeting in mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005;93(2-5):107-112.
- Yang Y., Glenn A.L., Raine A., Phil D. Brain abnormalities in antisocial individuals: implications for the law. *Behav. Sci. Law*. 2008;26:65-83. DOI: 10.1002/bsl.788

Межлинейные различия мышей по температурной реакции на интраназальное введение наночастиц оксида платины

Д.В. Петровский¹, А.В. Ромашенко^{1, 2}, С.Ю. Троицкий³, М.П. Мошкин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Одними из компонентов пыли с доказанными токсическими эффектами на дыхательную и сердечно-сосудистую системы являются различные соединения тяжелых металлов. Известно, что при воздействии тяжелых металлов на дыхательную систему происходит понижение температуры тела животного, которое считается адаптивной реакцией, уменьшающей интенсивность проникновения токсиканта. Для изучения вклада растворимых и нерастворимых форм ксенобиотиков в развитие гипотермического ответа в данной работе проводили сравнение изменения температуры тела мышей в ответ на интраназальное введение коллоидного раствора наночастиц оксида платины (PtO-НЧ) и истинного раствора соли платины ($K_2[PtCl_4]$). Значение генетической изменчивости было исследовано на 6 инбредных (BALB/cJ, C57BL/6J, AKR/OlaHsd, DBA/2JRccHsd, C3H/HeNHsd, SJL/J) и 2 аутбредных линиях (SCID и CD1) мышей. Наиболее выраженное снижение температуры в ответ на интраназальное введение ирританта продемонстрировали мыши линий BALB/cJ и SCID, при этом амплитуда падения температуры тела ($\Delta t_{\text{тела}}$) в ответ на введение PtO-НЧ была больше, чем на $K_2[PtCl_4]$. Механизм снижения температуры тела при интраназальном введении ксенобиотика определяли путем сравнения $\Delta t_{\text{тела}}$ для интраназального, внутривенного и перорального введения PtO-НЧ. Ни внутривенное, ни пероральное введение наночастиц не вызывало значимого изменения $t_{\text{тела}}$ животного, что в совокупности с данными по динамике снижения температуры (max $\Delta t_{\text{тела}}$ ~ 80–100 мин) позволяет предположить опосредованный нервной системой механизм регуляции изменения $t_{\text{тела}}$, который может реализоваться за счет активации афферентных волокон тройничного нерва. Корреляции данных по max $\Delta t_{\text{тела}}$ в ответ на интраназальное введение PtO-НЧ и ряда известных фенотических характеристик (phenome.jax.org) использованных нами линий подтверждают это предположение.

Ключевые слова: наночастицы; интраназальное введение; терморегуляция; гипотермия.

Between-strain differences in hypothermic response in mice after intranasal administration of PtO nanoparticles

D.V. Petrovskii¹, A.V. Romashchenko^{1, 2}, S.Yu. Troitskii³, M.P. Moshkin¹

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

² Design Technological Institute of Digital Technique SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Borekov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, Russia

Air pollution by particulate matter (PM) has been associated with cardiopulmonary morbidity and mortality in many recent epidemiological studies. It has been shown that transition metal compounds, well-known toxic components of PM, are able to induce hypothermia following whole-body inhalation exposure. Low temperature appears to protect tissue against toxic effects of PM metal compounds *in vivo* and *in vitro*. To study the role of soluble and insoluble irritants in the induction of the hypothermic response, we analyzed the decrease in mouse body temperature (Δt_{body}) after intranasal administration of PtO nanoparticles or a $K_2[PtCl_4]$ solution. Between-strain differences in Δt_{body} after intranasal administration of the irritants were evaluated using 6 inbred (BALB/cJ, C57BL/6J, AKR/OlaHsd, DBA/2JRccHsd, C3H/HeNHsd, and SJL/J) and 2 outbred mouse strains (SCID and CD1). BALB/cJ and SCID mice showed the most pronounced effect of intranasal administration of the xenobiotic on t_{body} . Thus, t_{body} was significantly lower after nasal administration of the PtO nanoparticles than after administration of the $K_2[PtCl_4]$ solution. To study the mechanism of this decrease, we compared the respective values for Δt_{body} following intranasal, intravenous and per oral administration of PtO nanoparticles in Balb/c mice. Neither intravenous nor per oral administration had any effect on mouse body temperature. This fact together with data on the dynamics of the decrease in mouse body temperature following after intranasal administration of PtO nanoparticles (max Δt_{body} ~ 80–100 min) allowed us to assume that this process is under nervous regulation. The correlation found between our

data and some well-known phenotypic characteristics (phenome.jax.org) of the mouse strains used confirms this hypothesis.

Key words: nanoparticles; intranasal administration; thermoregulation; hypothermia.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Петровский Д.В., Ромашенко А.В., Троицкий С.Ю., Мошкин М.П. Межлинейные различия мышей по температурной реакции на интраназальное введение наночастиц оксида платины. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):439-444. DOI 10.18699/VJ15.058

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Petrovskii D.V., Romashchenko A.V., Troitskii S.Yu., Moshkin M.P. Between-strain differences in hypothermic response in mice after intranasal administration of PtO nanoparticles. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):439-444. DOI 10.18699/VJ15.058

К настоящему времени накоплено большое количество данных, свидетельствующих о связи между содержанием пылевых частиц (particulate matter, PM) в воздухе на урбанизированных территориях и поражением респираторной и сердечно-сосудистой систем (Dockery, Pope, 1994; Brook et al., 2010). Наибольшей биологической активностью обладают PM, размеры которых не превышают 2,5 мкм (PM_{2,5}) (Diociaiuti et al., 2001). В состав PM входят продукты сгорания автомобильного топлива (ПСАТ), которые вносят значительный вклад в токсические эффекты, наблюдаемые на урбанизированных территориях (Ulfvarson et al., 1991; Mills et al., 2005). Одними из компонентов ПСАТ, для которых доказаны токсические эффекты, являются соединения тяжелых металлов (Nap et al., 2001). Существуют данные о связи концентрации платины в эпителии носовой полости и количества лейкоцитов в смывах носа человека (Schins et al., 2004). Известно, что при ингаляционном введении растворимые соединения Ni (II) и V (II) вызывают у мышей брадикардию и нарушение дыхательного ритма (Dreher et al., 1997; Dye et al., 1999). Кроме того, продемонстрировано, что многие растворимые соединения металлов при ингаляционном введении способны также вызывать гипотермию (Camren et al., 2001). Предполагается, что снижение температуры тела в ответ на предъявление ксенобиотика является адаптивной реакцией организма, направленной на снижение общего метаболизма, что позволяет понизить скорость распространения данного соединения и уменьшить его токсические эффекты (Gordon, 1991). При этом не ясно, способны ли нерастворимые формы ксенобиотиков, например оксиды, гидроксиды, металлические формы (0), попадая в организм, влиять на поддержание температурного гомеостаза.

Реакции организма на внешнесредовые воздействия, включая ингаляцию наночастиц, характеризуются значительной генетической изменчивостью (Мошкин и др., 2011; Aoki et al., 2001; Xiao et al., 2003). Анализ генотип-зависимых особенностей реагирования на естественные и антропогенные загрязнители имеет существенное значение для разработки критериев профессионального отбора людей, а также для подбора адекватных тест-объектов в токсикологических исследованиях.

В данной работе для оценки вклада генетической изменчивости в реакцию организма на интраназальную аппликацию наночастиц была исследована динамика температуры тела при введении в носовую полость наночастиц оксида платины (II) у мышей 6 инбредных и 2 аутбредных

линий. Был также проведен анализ корреляций между межлинейными различиями по температурной реакции на наночастицы и фенотипическими характеристиками, представленными для исследованных линий в базе данных phenome.jax.org.

Материалы и методы

Животные

Эксперименты выполнены на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005; RFMEFI62114X0010).

Исследование проводилось на самцах мышей в возрасте 7–10 нед. Животных содержали группами по 5 особей в индивидуально вентилируемых клетках OptiMICE при температуре 23 °C (±2 °C), влажности 30–50 %, 12-часовом световом периоде (свет включался в 03:00), на стандартном рационе без ограничения доступа к корму и воде. Все животные были SPF-статуса (specific pathogen free). Исследовано 6 инбредных (BALB/cJ, C57BL/6J, AKR/OlaHsd, DBA/2JrccHsd, C3H/HeNHsd, SJL/J) и 2 аутбредные линии мышей (SCID и CD1). Масса тела и базальная температура (средние значения за 7 дней) тела исследованных животных приведены в таблице.

Синтез наночастиц PtO-Ч

Наноразмерные частицы платины PtO-Ч синтезировали с использованием промежуточного синтеза полиядерных гидроксокомплексов платины (II). Для этого к раствору тетрахлоороплатината калия (K₂[PtCl₄]) с концентрацией 1,25 × 10⁻³ М по каплям, при энергичном перемешивании, приливали раствор NaOH (1 М) в мольном соотношении K₂[PtCl₄]/NaOH = 4. Стехиометрический состав полиядерных гидроксокомплексов платины (II) соответствует формуле Pt(OH)₂, кислотность таких коллоидных растворов нестабильна и снижается в процессе их старения. В данной работе в течение 20 мин после добавления всей щелочи к раствору Pt(II) значение pH изменилось с 7,2 до 5,1. Образовавшуюся суспензию отмывали большим избытком воды, а после центрифугирования и декантации в продукт был добавлен фосфатный буфер (pH 7,3–7,5), в котором концентрация Pt(II) составила 0,05 М.

Характеристика частиц

Параметры агрегации НЧ в суспензиях определяли методом динамического светорассеяния (dynamic light scattering, DLS) с помощью Zetasizer NanoZS (Malvern,

Средние значения среднесуточной базальной температуры и массы тела животных использованных линий

Линия	Количество животных	Масса тела, г $X \pm SE$	Температура тела, °C $X \pm SE$
CD1	5	24,9 ± 1,0	36,2 ± 0,32
AKR/OlaHsd	5	22 ± 0,7	36,6 ± 0,13
DBA/2JrccHsd	5	19,9 ± 0,8	36,8 ± 0,15
C57BL/6J	5	18,6 ± 0,2	36,4 ± 0,12
SCID	5	21,1 ± 0,7	36,2 ± 0,17
BALB/cJ	5	23,2 ± 0,3	35,9 ± 0,07
SJL/J	5	20,5 ± 0,4	36,8 ± 0,17
C3H/HeNHsd	5	23,2 ± 0,2	36,5 ± 0,21

Англия), имеющего разрешающую способность 0,3 нм – 10 мкм. Величину поверхностного заряда определяли методом электрофореза, с разрешающей способностью $0,12 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1}$ для водных систем. Измерения проводили в соответствии со стандартными протоколами.

Морфологию и размеры НЧ в суспензиях изучали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM 1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой Veleta (SIS, Германия). Препараты сорбировали в течение 30 с на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, стабилизированной напылением углерода в установке Vacuum Evaporator JEE-420 (Jeol, Япония). Излишки жидкости оттягивали фильтровальной бумагой, сетки высушивали на воздухе. В каждом препарате определяли средний размер НЧ путем измерения 100 частиц с четкими границами, используя программы iTEM, версия 5.2 (JEOL, Япония).

Для изучения кристаллической структуры НЧ с помощью просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения JEM-2010 (Jeol, Япония), суспензию НЧ наносили на сетки с углеродной пленкой, применяя ультразвуковой диспергатор.

Поскольку токсикантом являются как частицы, так и ионы платины (II), при исследовании влияния интраназального введения ксенобиотика на снижение температуры тела мыши принципиальным является степень растворимости используемых частиц в естественных средах. Для оценки растворимости используемые частицы в течение 48 ч содержали при pH = 4,0, что соответствует pH лизосом (Zhu et al., 2012). Концентрацию ионов платины в растворе определяли с помощью УФ-виз-спектрофотометрии по стандартной методике (Georgieva, Andonovski, 2003). В течение 48 ч достоверного увеличения ионов платины в растворе не произошло.

Интраназальное введение

Мышь в бодрствующем состоянии брали в руку с захватыванием кожи спины на затылке большим и указательным пальцами, максимально ограничивая вращение головы, остальными пальцами этой же руки удерживали задние конечности и хвост таким образом, чтобы мышь находилась параллельно поверхности стола, животом книзу. Свободной рукой с помощью пипетки осторожно подносили каплю препарата к носу, ожидая, пока мышь сама его вдохнет. Вводили по 7 мкл препарата в каждую ноздрю.

Измерение температуры

Для измерения температуры тела использовали температурные датчики накопительного типа (ДТНЗ-28 производства ООО «ЭМБИ»). Масса датчика 0,8 г, точность 0,1 °C). Датчики имплантировали животным внутрибрюшинно под изофлорановым наркозом. Имплантацию проводили не менее чем за 7 дней до введения наночастиц. Датчики были настроены на измерение температуры тела каждые 5 мин. Считывание данных с помощью бесконтактного ридера проводили через 6 ч после введения наночастиц.

Статистика

Для сравнения двух средних использовали *t*-тест Стьюдента. Для множественных сравнений средних использовали LSD-тест (Least Significant Difference). Данные выражали как средние ± SE. В качестве параметра, характеризующего снижение температуры тела животных в ответ на введение препарата, была взята разница ($\Delta t_{\text{тела}}$) между минимальным значением температуры за 15-минутный интервал в периоде с 5-й по 140-ю мин и фоновым значением температуры тела (таблица), измеренным за 30 мин до начала теста. При сопоставлении собственных результатов с фенотипическими параметрами из базы данных phenome.jax.org рассчитывали коэффициенты ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

Через 10–20 мин после интраназального введения наночастиц наблюдалось снижение температуры тела, достигшее уровня статистической значимости у мышей линии BALB/cJ и SCID (рис. 1, а). Минимальный уровень температуры тела был отмечен у мышей линии BALB/cJ через 97 ± 16 мин, а у мышей линии SCID – через 76 ± 6 мин. По величине гипотермической реакции исследуемые линии распределялись следующим образом: BALB/cJ > SCID > AKR/OlaHsd > DBA/2JrccHsd > CD1 > C57BK/6J > SJL/J > C3H/HeNHsd (рис. 1, б). Вызванное аппликацией наночастиц падение температуры тела не зависело ни от массы тела животных, ни от фоновых значений базальной температуры тела (таблица).

На мышах линии BALB/cJ, которые демонстрировали наибольший гипотермический ответ, была исследована температурная реакция на интраназальное введение наночастиц оксида платины (II) и растворимого прекурсора

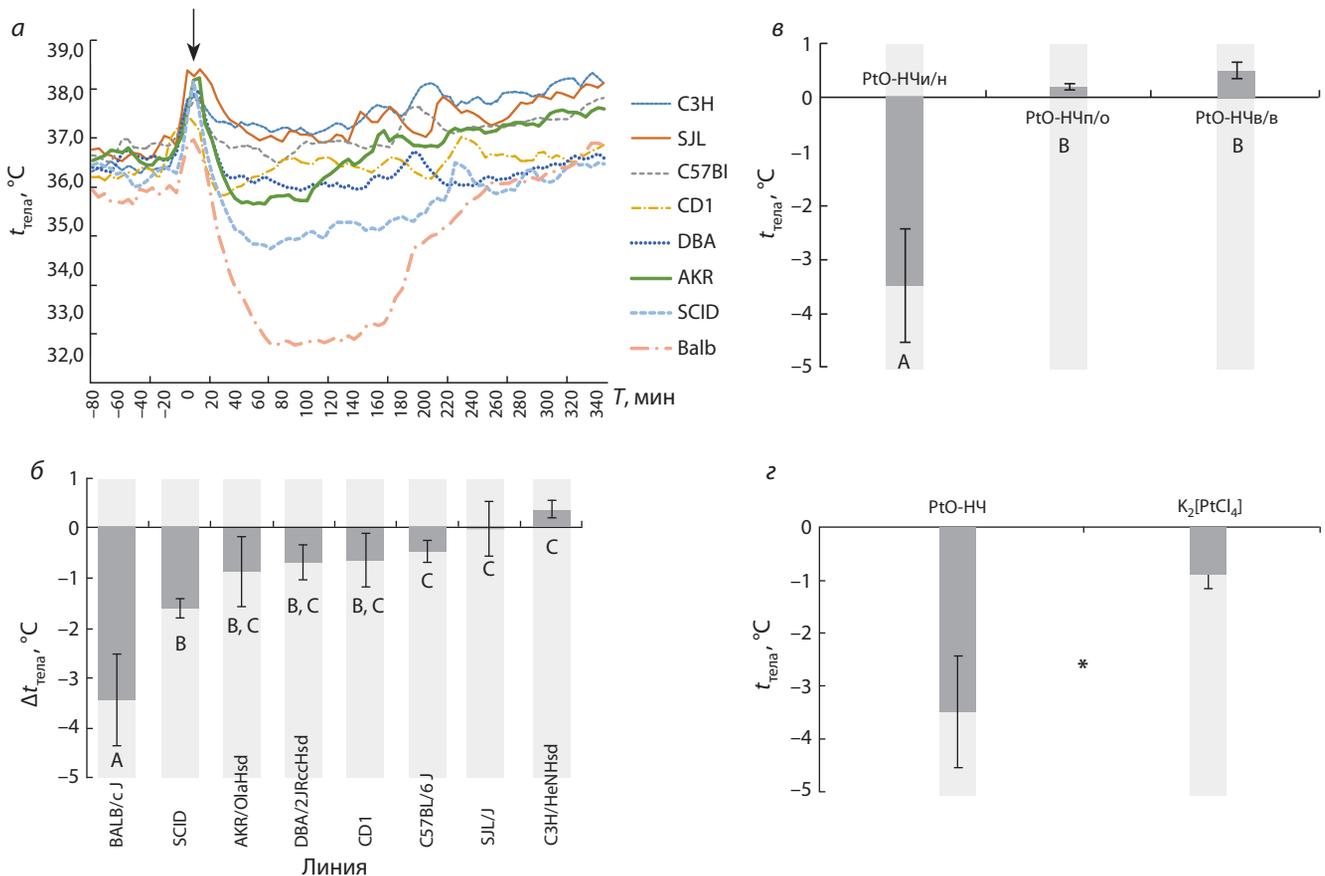


Рис. 1. Изменение температуры тела мышей при введении PtO-NH₄ и раствора K₂[PtCl₄].

a – динамика изменения температуры тела ($t_{\text{тела}}^{\circ\text{C}}$) после интраназального введения PtO-NH₄ (черная стрелка); *б* – межлинейное сравнение средних значений (Mean \pm SE) амплитуды падения $t_{\text{тела}}^{\circ\text{C}}$ животного при интраназальном введении PtO-NH₄; *в* – сравнение амплитуды падения $t_{\text{тела}}^{\circ\text{C}}$ у мышей линий Balb/cj при интраназальном (и/н), внутривенном (в/в) и пероральном (п/о) введении PtO-NH₄ ($0,75 \times 10^{-6}$ М по Pt/кг); *з* – сравнение амплитуды падения $t_{\text{тела}}^{\circ\text{C}}$ у мышей линий Balb/cj при интраназальном введении 14 мкл PtO-NH₄ ($1,25 \times 10^{-3}$ М по Pt) и K₂[PtCl₄] ($1,25 \times 10^{-3}$ М). А, В, С – достоверные отличия средних значений по LSD-тесту ($p < 0,05$, $n = 5$). * – достоверные отличия по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$, $n = 5$).

PtO-NH₄ – тетрахлороплатината калия (K₂[PtCl₄]). Гипотермический эффект PtO-NH₄ существенно превосходил таковой раствора K₂[PtCl₄] (рис. 1, з). При этом ни внутривенное, ни пероральное введение PtO-NH₄ достоверных изменений температуры тела не вызывало (рис. 1, в).

Для 5 линий мышей, использованных в нашем исследовании (BALB/cJ, C57BL/6J, AKR/OlaHsd, DBA/2JRCcHsd, C3H/HeNHsd), имеются данные по фенотипированию, проведенному в Джексонской лаборатории (США, Мэн). Это позволило проанализировать корреляции между средними по линии значениями ряда тестов, взятых из этой базы данных, и средними по линии значениями $\Delta t_{\text{тела}}$. Показано, что $\Delta t_{\text{тела}}$ высокодостоверно коррелировала с амплитудой реакции в поведенческом тесте по оценке стартл-рефлекса у различных линий мышей (рис. 2, а). Кроме того, достоверные корреляции были получены между $\Delta t_{\text{тела}}$ и результатами теста по оценке моргательного рефлекса (ранговая оценка ответа мыши на щипок века, рис. 2, б).

Обсуждение

Показано, что ингаляция ряда ксенобиотиков вызывает снижение температуры тела животного (Watkinson et al., 2001), что рассматривается как адаптивная реакция,

направленная на снижение интенсивности накопления поллютантов (Gordon, 1991). Большая часть этих работ выполнена на основе растворимых соединений, тогда как температурные эффекты нерастворимых форм практически не изучены. Одними из наиболее значимых токсикантов, входящих в состав PM_{2,5}, являются соединения платины, которые попадают в атмосферу вместе с выхлопными газами (Moldovan et al., 2002). Сравнение температурной реакции мышей на интраназальную аппликацию наночастиц платины (II) и их растворимого прекурсора показало более выраженный эффект нерастворимой формы данного металла. Это ставит вопрос о роли твердых аэрозолей, образованных, прежде всего, оксидами тяжелых металлов, в реализации токсических эффектов PM_{2,5}. Как было показано в эпидемиологических исследованиях, повышение концентрации PM_{2,5} способно вызывать кардиоваскулярные, респираторные и другие нарушения, вплоть до внезапной смерти (Burnett et al., 1995; Schwartz, Morris, 1995).

Анализируя физиологические эффекты вдыхаемых ксенобиотиков, авторы большинства исследований рассматривают в качестве основного органа мишени легкие, а не носовую полость (Kodavanti et al., 1999). Однако в нашей

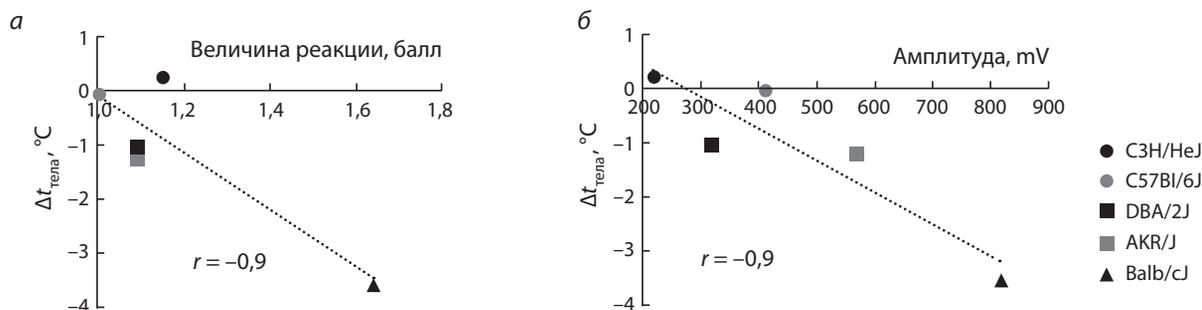


Рис. 2. Взаимосвязь среднего по линии значения амплитуды падения температуры тела при введении PtO-НЧ и различных фенотипических характеристик данной линии.

а – средние значения ранговой характеристики (0–2), оценивающей интенсивность моргания глаз мыши после щипка пинцетом за правое веко; *б* – амплитуда реакции животного после 16-го повторного предъявления акустического стимула (белый шум, 100 Дц). Для анализа взяты средние значения фенотипических характеристик инбредных линий животных, опубликованных в открытом доступе (phenome.jax.org); *r* – непараметрический коэффициент корреляции Спирмена ($p < 0,05$).

работе впервые установлено, что интраназальное введение частиц оксида платины и их растворимого прекурсора вызывает снижение температуры тела животного.

Был проведен анализ связей между амплитудой падения температуры, индуцированного токсикантом, и различными известными фенотипическими характеристиками линий мышей. У гомойотермных животных снижение температуры «ядра» тела обычно сопряжено с увеличением теплоотдачи, которое реализуется за счет вазодилатации сосудов кожи и слизистых. Также возможной причиной гипотермии может быть снижение уровня энергетического метаболизма (Morrison, Nakamura, 2011). Поскольку в отличие от интраназальной аппликации ни пероральное, ни внутривенное введение соответствующего количества PtO-НЧ не вызывает снижения температуры, можно исключить гипотезу о «токсической» гипотермии, возникающей при распространении токсиканта через кровеносное русло по всему организму (Gordon, 1991). Так как известно, что падение температуры при активации Toll-like рецепторов тучных клеток назального мукозального слоя начинается не ранее, чем через 60 мин после введения LPS или 1V136, специфического агониста TRL7 (Hayashi et al., 2008), а в наших экспериментах падение температуры начиналось практически сразу после введения частиц (рис. 1, *а*), вероятнее всего, наблюдаемый эффект гипотермии реализуется за счет нервной регуляции теплоотдачи, т. е. за счет изменения «установочной точки» в центрах терморегуляции.

При анализе межлинейных различий температурной реакции было уделено основное внимание связям между амплитудой падения температуры и особенностями реагирования нервной системы, а именно тестам, оценивающим болевую чувствительность, сенсомоторным тестам, тестам на оценку способности к фильтрации сенсорной информации (sensory gating). Было установлено, что снижение температуры тела обратно коррелировало с амплитудой акустического startle-рефлекса. Данный тест оценивает по интенсивности двигательного ответа на повторяющиеся акустические раздражители способность животного «отфильтровывать» иррелевантную информацию. Рядом авторов с помощью прямых электрофизиологических

опытов для различных структур мозга было показано, что выраженная способность осуществлять сенсорную фильтрацию («sensory gating») сочетается с большим количеством и более высокой активностью ГАМКергических нейронов в данной области (McCormick, Bal, 1994).

Кроме того, удалось обнаружить корреляцию между степенью выраженности роговичного рефлекса и амплитудой падения температуры при интраназальном введении PtO-НЧ. Интенсивность проявления роговичного или моргательного рефлекса характеризует чувствительность VI ветки тройничного нерва, который иннервирует респираторную часть носовой полости. Аfferентные волокна тройничного нерва способны реагировать на стимулы различной модальности: падение pH (Bryant, Moore, 1995), механическую деформацию (Vecera et al., 2006), температуру (Hayama, 2014), углекислый газ (Komai, Bryant, 1993). Кроме того, известно, что ядра тройничного нерва в пластинке I спинного мозга связаны с медиальными ядрами преоптической области гипоталамуса, участвующими в регуляции температурного гомеостаза (Uradhuay et al., 2008). Таким образом, проведенный анализ дает основания полагать, что снижение температуры тела животного в ответ на интраназальное введение PtO-НЧ может осуществляться через активацию чувствительных волокон тройничного нерва, иннервирующих носовую полость, что приводит к изменению «установочной точки» в преоптической области гипоталамуса.

Корреляционный анализ показал, что способность к фильтрации иррелевантной информации и высокая болевая чувствительность окончаний тройничного нерва сочетались с высокой амплитудой изменения температуры тела в ответ на предоставление ксенобиотика. Полученные результаты свидетельствуют о том, что межлинейные различия по амплитуде падения температуры в ответ на интраназальное введение PtO-НЧ могут определяться как «чувствительностью» аfferентных волокон тройничного нерва, иннервирующих носовую полость, так и особенностями работы центральных структур («sensory gating»), выраженных в активности ГАМКергических нейронов структур мозга, ответственных за реализацию данного эффекта.

Таким образом, 1) при попадании в организм нерастворимые соединения металлов могут вызывать большее по амплитуде падение температуры тела животного по сравнению с растворимыми; 2) эпителий носовой полости играет значимую роль в реализации эффекта снижения температуры тела при ингаляции ксенобиотиков; 3) величина гипотермической реакции на интраназальное введение наночастиц существенно варьирует в зависимости от генетической линии мышей.

Благодарности

Задачи проведенного исследования были сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-14-00221) и государства в лице Минобрнауки России (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.621.21.0010 от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Мошкин М.П., Пельтек С.Е., Герлинская Л.А., Горячковская Т.Н., Концевая Г.В., Масленникова С.О., Попик В.В., Колчанов Н.А. Острая иммуно-физиологическая реакция мышей разных генотипов на поступление наночастиц SiO₂ (Таркосил 25) в верхние дыхательные пути. *Рос. нанотехнологии*, 2011;6(9/10):47-54.
- Aoki Y., Sato H., Nishimura N., Takahashi S., Itoh K., Yamamoto M. Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicol. Appl. Pharm.* 2001;173(3):154-160.
- Becerra L., Morris S., Bazes S., Gostic R., Sherman S., Gostic J., Pendse G., Moulton E., Scrivani S., Keith D., Chizh B., Borsook D. Trigeminal neuropathic pain alters responses in CNS circuits to mechanical (brush) and thermal (cold and heat) stimuli. *J. Neurosci.* 2006;26(42):10646-10657.
- Brook R.D., Rajagopalan S., Pope C.A. 3rd, Brook J.R., Bhatnagar A., Diez-Roux A.V., Holguin F., Hong Y., Luepker R.V., Mittleman M.A., Peters A., Siscovick D., Smith S.C. Jr, Whitsel L., Kaufman J.D. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease an update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2010;121(21):2331-2378.
- Bryant B.P., Moore P.A. Factors affecting the sensitivity of the lingual trigeminal nerve to acids. *Am. J. Physiol.-Reg. Integr. Compar. Physiol.* 1995;268(1):R58-R65.
- Burnett R.T., Dales R., Krewski D., Vincent R., Dann T., Brook J.R. Associations between ambient particulate sulfate and admissions to Ontario hospitals for cardiac and respiratory diseases. *Am. J. Epidemiol.* 1995;142(1):15-22.
- Campen M.J., Nolan J.P., Schladweiler M.C.J., Kodavanti U.P., Evansky P.A., Costa D.L., Watkinson W.P. Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transition metals: a potential interaction between nickel and vanadium sulfate. *Toxicol. Sci.* 2001;64(2):243-252.
- Diociaiuti M., Balduzzi M., De Berardis B., Cattani G., Stacchini G., Ziemacki G., Marconi A., Paoletti L. The two PM 2.5 (fine) and PM 2.5-10 (coarse) fractions: evidence of different biological activity. *Environ. Res.* 2001;86(3):254-262.
- Dockery D.W., Pope C.A. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Publ. Health.* 1994;15(1):107-132.
- Dreher K.L., Jaskot R.H., Lehmann J.R., Richards J.H., McGee J.K., Ghio A.J., Costa D.L. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1997;50(3):285-305.
- Dye J.A., Adler K.B., Richards J.H., Dreher K.L. Role of soluble metals in oil fly ash-induced airway epithelial injury and cytokine gene expression. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 1999;277(3):L498-L510.
- Georgieva M., Andonovski B. Determination of platinum (IV) by UV spectrophotometry. *Analyt. Bioanal. Chem.* 2003;375(6):836-839.
- Gordon C.J. Toxic-induced hypothermia and hypometabolism: Do they increase uncertainty in the extrapolation of toxicological data from experimental animals to humans? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1991;15(1):95-98.
- Han J.Y., Takeshita K., Utsumi H. Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles. *Free Radical Biol. Med.* 2001;30(5):516-525.
- Hayama T. Thermoreceptive neurons in the dorsal portion of the trigeminal principal nucleus in rats. *Neurosci. Lett.* 2014;564:53-56.
- Hayashi T., Cottam H.B., Chan M., Jin G., Tawatao R.I., Crain B., Ronacher L., Messer K., Carson D.A., Corr M. Mast cell-dependent anorexia and hypothermia induced by mucosal activation of Toll-like receptor 7. *Am. J. Physiol.-Reg. Integr. Compar. Physiol.* 2008;295(1):R123-R132.
- Kodavanti U.P., Jackson M.C., Ledbetter A.D., Richards J.R., Gardner S.Y., Watkinson W.P., Campen M.J., Costa D.L. Lung injury from intratracheal and inhalation exposures to residual oil fly ash in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1999;57(8):543-563.
- Komai M., Bryant B.P. Acetazolamide specifically inhibits lingual trigeminal nerve responses to carbon dioxide. *Brain Res.* 1993;612(1):122-129.
- McCormick D.A., Bal T. Sensory gating mechanisms of the thalamus. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994;4(4):550-556.
- Mills N.L., Törnqvist H., Robinson S.D., Gonzalez M., Darnley K., MacNee W., Boon N.A., Donaldson K., Blomberg A., Sandstrom T., Newby D.E. Diesel exhaust inhalation causes vascular dysfunction and impaired endogenous fibrinolysis. *Circulation.* 2005;112(25):3930-3936.
- Moldovan M., Palacios M.A., Gómez M.M., Morrison G., Rauch S., McLeod C., Ma R., Caroli S., Alimonti A., Petrucci F., Bocca B., Schramel P., Zischka M., Pettersson C., Wass U., Luna M., Saenz J.C., Santamaría J. Environmental risk of particulate and soluble platinum group elements released from gasoline and diesel engine catalytic converters. *Sci. Total Environ.* 2002;296(1):199-208.
- Morrison S.F., Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. *Frontiers Biosci.* 2011;16:74.
- Schins R.P., Polat D., Begeerow J., Turfeld M., Becker A., Borm P.J. Platinum levels in nasal lavage fluid as a biomarker for traffic-related exposure and inflammation in children. *Sci. Total Environ.* 2004;334:447-455.
- Schwartz J., Morris R. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Detroit, Michigan. *Am. J. Epidemiol.* 1995;142(1):23-35.
- Ulfvarson U., Alexandersson R., Dahlqvist M., Ekholm U., Bergström B. Pulmonary function in workers exposed to diesel exhausts: the effect of control measures. *Am. J. Ind. Med.* 1991;19(3):283-289.
- Upadhyay J., Knudsen J., Anderson J., Becerra L., Borsook D. Non-invasive mapping of human trigeminal brainstem pathways. *Magn. Reson. Med.* 2008;60(5):1037-1046.
- Watkinson W.P., Campen M.J., Nolan J.P., Costa D.L. Cardiovascular and systemic responses to inhaled pollutants in rodents: effects of ozone and particulate matter. *Environ. Health Persp.* 2001;109(4):539.
- Xiao G.G., Wang M., Li N., Loo J.A., Nel A.E. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 2003;278(50):50781-50790.
- Zhu H., Fan J., Xu Q., Li H., Wang J., Gao P., Peng X. Imaging of lysosomal pH changes with a fluorescent sensor containing a novel lysosome-locating group. *Chem. Commun.* 2012;48(96):11766-11768.

Изменения транскриптома префронтальной коры мозга при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS

Н.А. Стефанова¹, Е.Е. Корболина¹, Н.И. Ершов¹, Е.И. Робаев¹, Н.Г. Колосова^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое становится причиной деменции на фоне атрофических изменений мозга. Заболеваемость БА растет по мере увеличения продолжительности жизни и старения населения развитых стран. Эффективных методов профилактики БА нет, что обусловлено неполнотой знаний патогенеза заболевания и отсутствием его адекватных биологических моделей. Недавно мы показали, что перспективной моделью БА являются преждевременно стареющие крысы OXYS, ускоренное старение мозга которых происходит на фоне характерных признаков заболевания: дегенеративных изменений и гибели нейронов, снижения плотности синапсов, дисфункции митохондрий, гиперфосфорилирования тау-белка, повышения уровня амилоида бета ($A\beta_{1-42}$) и образования амилоидных бляшек. Выясняя природу их развития, в настоящей работе исследовали методом RNA-seq транскриптом префронтальной коры мозга крыс OXYS в период манифестации признаков БА (возраст 5 мес.) и их активной прогрессии (возраст 18 мес.), используя в качестве контроля одновозрастных крыс Вистар. У крыс OXYS и Вистар в возрасте 5 мес. в префронтальной коре мозга значимо ($p < 0,01$) различался уровень мРНК более 900 генов, в возрасте 18 мес. – более 2 000 генов, основная часть которых связана с нейрональной пластичностью, фосфорилированием белка, Ca^{2+} гомеостазом, гипоксией, иммунными процессами и апоптозом. В возрастной период с 5 до 18 мес. у крыс Вистар изменялась экспрессия 499 генов, у крыс OXYS – более 5 500 генов. Из них только 333 гена были общими для крыс OXYS и Вистар, что свидетельствует о различиях в механизмах и скорости возрастных изменений мозга при нормальном темпе старения и развитии характерных для БА нейродегенеративных процессов.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; крысы OXYS; транскриптом мозга; RNA-seq.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Ершов Н.И., Робаев Е.И., Колосова Н.Г. Изменения транскриптома префронтальной коры мозга при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):445-454. DOI 10.18699/VJ15.059

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Stefanova N.A., Korbolina E.E., Ershov N.I., Rogaev E.I., Kolosova N.G. Changes in the transcriptome of the prefrontal cortex of OXYS rats as the signs of Alzheimer's disease development. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):445-454. DOI 10.18699/VJ15.059

DOI 10.18699/VJ15.059

УДК 616.894-053.8

Поступила в редакцию 11.08.2015 г.

Принята к публикации 31.08.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Changes in the transcriptome of the prefrontal cortex of OXYS rats as the signs of Alzheimer's disease development

N.A. Stefanova¹, E.E. Korbolina¹, N.I. Ershov¹, E.I. Rogaev¹, N.G. Kolosova^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disease. It produces atrophic changes in the brain, which cause dementia. The incidence of AD is increasing with increasing life expectancy and gradual aging of the population in developed countries. There are no effective prophylactic interventions because of insufficient understanding of the AD pathogenesis and the absence of adequate experimental models. Recently, we showed that senescence-accelerated OXYS rats represent a promising model of AD; in these rats, accelerated aging of the brain is accompanied by the typical signs of AD: degenerative alterations and death of neurons, a decrease in synaptic density, mitochondrial dysfunction, hyperphosphorylation of the tau protein, an increased level of amyloid β ($A\beta_{1-42}$), and the formation of amyloid plaques. To elucidate how these signs develop, we used a next-generation RNA sequencing technique (RNA-Seq) to study the prefrontal-cortex transcriptome of OXYS rats during the manifestation of AD signs (at an age of 5 months) and during their active progression (at an age of 18 months), using age-matched Wistar rats (parental strain) as controls. At the age of 5 months, there were significant differences between OXYS and Wistar rats ($p < 0,01$) in the mRNA expression of more than 900 genes (> 2 000 genes at the age of 18 months) in the prefrontal cortex. Most of these genes were related to neuronal plasticity, protein phosphorylation, Ca^{2+} homeostasis, hypoxia, immune processes, and apoptosis. Between the ages of 5 and 18 months, there were changes in the expression of 499 genes in Wistar rats and changes in the expression of 5 500 genes in OXYS rats. Only 333 genes were common between these sets. This finding points to differences in the mechanisms and rates of age-related changes in the brain between normal aging and the period of development of AD-specific neurodegenerative processes.

Key words: Alzheimer's disease; OXYS rats; brain transcriptome; RNA-seq.

Блезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое становится причиной деменции на фоне атрофических изменений мозга и в конечном счете – смерти в течение 3–9 лет после постановки диагноза (Querfurth, LaFerla, 2010). Заболеваемость растет по мере увеличения продолжительности жизни и старения населения развитых и развивающихся стран: по данным ВОЗ, в мире более 35 млн человек страдают БА, а к 2050 г., по прогнозам, таких больных будет > 115 млн (Morley et al., 2012). Эффективных способов профилактики и лечения БА нет, что обусловлено неполнотой знаний патогенеза заболевания, поздней постановкой диагноза, которая базируется в основном на оценке когнитивных нарушений и поведения, наличие которых регистрируется уже на фоне необратимых нейродегенеративных изменений. Это определяет актуальность исследования молекулярно-генетических механизмов развития БА и разработки на их основе новых способов профилактики и лечения заболевания и маркеров для ранней диагностики БА.

Различают две формы БА: наследственную и sporadическую. На первую приходится только около 5 % случаев БА, она развивается в возрасте до 65 лет, чаще – до 40–50 лет и обусловлена мутациями в генах *APP*, *PSEN1* и *PSEN2*. Остальные 95 % случаев приходятся на sporadическую форму заболевания, возраст развития которой – больше 65 лет (Krstic, Knuesel, 2013). В ходе усиленных исследований механизмов БА в последние 20 лет было выдвинуто несколько гипотез ее этиологии и патогенеза, доминирующей среди них стала гипотеза «амилоидного каскада», основанная на исследованиях генетических форм БА и выявленных нейротоксических эффектах пептида амилоида- β ($A\beta_{1-42}$) как центрального события в каскаде патологических процессов (Morley et al., 2012). Однако в последние годы растет число убедительных аргументов в пользу того, что эта гипотеза оправдана, скорее всего, только для наследственной формы БА. Недавние исследования свидетельствуют о том, что накопление токсических форм $A\beta$ при развитии sporadической формы БА может быть опосредовано синаптическими процессами (Shinohara et al., 2014).

Несмотря на выявленные ассоциации с полиморфизмами в ряде генов (Bertram et al., 2007), конкретные молекулярно-генетические механизмы развития sporadической формы БА, перехода физиологических возрастных изменений мозга в патологический процесс остаются не ясными. Анализ изменений транскриптома, предшествующих и сопутствующих фенотипическим проявлениям старения и развитию связанных с ним заболеваний, – продуктивный подход к поиску молекулярных мишеней-генов, вовлеченных в их этиологию и патогенез, но проводить такие исследования на людях проблематично, особенно на доклинических стадиях БА, манифестация которых происходит позднее, чем формируются нейродегенеративные изменения и развиваются лежащие в их основе события на молекулярном уровне. Наши исследования показали, что уникальной генетической моделью преждевременного старения и связанных с ним заболеваний является линия крыс OXYS, созданная в ИЦиГ СО РАН селекцией и инбридингом крыс Вистар, чувствительных к катаракто-

генному эффекту галактозы. В пяти первых поколениях развитие катаракты провоцировали нагрузкой галактозой, в дальнейшем отбор вели по ранней спонтанной катаракте, сцепленно с которой животные унаследовали комплекс признаков преждевременного старения, в том числе ускоренное старение мозга (Kolossova et al., 2009; Stefanova et al., 2010; Колосова и др., 2014). На фенотипическом уровне оно проявляется формированием уже к возрасту 3 мес. пассивного типа поведения, повышенной тревожности, нарушением способности к обучению на фоне нейродегенеративных изменений, выявленных методами магнитно-резонансной томографии (Колосова и др., 2011; Stefanova et al., 2014b). О снижении когнитивных функций у молодых крыс OXYS свидетельствует и нарушение формирования длительной посттетанической потенциации (Береговой и др., 2011). Методом QTL-анализа были выявлены локусы, ассоциированные с развитием у крыс OXYS катаракты, ретинопатии и особенностей поведения (Korbolina et al., 2012). Функциональная аннотация этих локусов выявила обогащение района генами, связанными с нейродегенерацией, в том числе с метаболическим путем БА. Действительно, проведенные нами исследования показали, что снижение когнитивных функций и изменение поведенческого стереотипа происходят у крыс OXYS на фоне развития характерных для БА признаков: дегенеративных изменений и гибели нейронов, снижения плотности синапсов, дисфункции митохондрий, гиперфосфорилирования тау-белка, повышения уровня $A\beta_{1-42}$ и образования амилоидных бляшек (Stefanova et al., 2014a, b, 2015a, b). Отсутствие в геноме крыс OXYS характерных для ранней формы заболевания мутаций в генах *App*, *Psen1* и *Psen2* (Stefanova et al., 2015a) позволяет рассматривать линию крыс OXYS как перспективную модель sporadической формы БА.

Цель настоящей работы – изучить транскриптом префронтальной коры мозга крыс OXYS в период активной манифестации и усиленной прогрессии признаков БА методом массового параллельного секвенирования, используя в качестве контроля одновозрастных крыс Вистар.

Материалы и методы

Работа выполнена методом RNA-seq на крысах OXYS и Вистар в возрасте 5 и 18 мес. ($n = 3$). Подготовка кДНК библиотек и секвенирование на платформе Illumina Genome Analyzer Ix проведены в соответствии с протоколами Illumina для RNA-seq (ОАО «Геноаналитика»). Для каждого образца было получено ~40 млн прочтений (ридов) длиной 50 нуклеотидов. Риды картировали на референсный геном *Rattus norvegicus* (версии Rnor_5.0.76) с помощью программы TopHat (v2.0.10) (Trapnell et al., 2009). Картированные последовательности были использованы для сборки транскриптома по референсному геному с помощью Cufflinks (v2.2.1). Полученная аннотация транскриптов была объединена с известными аннотациями ENSEMBL (Rnor, v5.0.76) и RefSeq (Rnor, v5.0) и использована совместно с данными картирования для составления таблиц числа ридов на ген (HTSeq2 с параметром MAQ > 10). Различия в экспрессии оценивали с помощью программных пакетов DESeq и DESeq2, использующих статистическую модель отрицательного

биномиального распределения (Anders, Huber, 2010). Одновременно такой же анализ выполнялся и для картированных, прошедших через удаление потенциальных ПЦР-дубликатов с помощью программы Picard Tools, с целью отследить и исключить возможную систематическую погрешность, принесенную на этапе амплификации библиотек. Уровень значимости изменения экспрессии рассчитывали с учетом поправки для множественных сравнений Бенджамини–Хохберга (БХ p -value, DESeq). При создании объединенного списка дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) учитывали гены без поправки на множественные сравнения с $p < 0,01$. Функциональную аннотацию групп ДЭГ проводили с помощью Web-инструмента DAVID и WebGestalt при порогах значимости обогащения (EASE) $p < 0,05$.

Результаты

Анализ данных секвенирования транскриптома (RNA-seq)

Установлено, что при заданной глубине секвенирования в префронтальной коре крыс OXYS и Вистар, согласно методу DESeq, экспрессируется около 15 200 генов. Согласно методу DESeq2 – около 21 200 генов. Поскольку перекрытие списков экспрессирующихся генов при оценке методами DESeq и DESeq2 составило 100 %, для дальнейшего анализа результатов секвенирования транскриптома префронтальной коры крыс использовали данные DESeq2. Установлено, что максимальное количество ридов было 2 687 083. Среднее значение уровня экспрессии по всем детектированным генам составило 1 422 рида. В таблице представлены 30 генов с наиболее высокой экспрессией в префронтальной коре крыс. Функциональный анализ обогащения терминами генных онтологий (Gene Ontology) транскриптома префронтальной коры крыс показал, что среди генов с самой высокой экспрессией представлены гены, ассоциированные с окислительным фосфорилированием, синтезом АТФ и белка, что связано с высоким уровнем метаболизма в мозге как наиболее активной и энергоемкой ткани в организме. Закономерно, что на высоком уровне экспрессируются гены, ассоциированные с обеспечением нейрональной пластичности и формированием межнейронных связей в мозге: передачей нервного импульса, синаптической передачей, транспортом белков, регуляцией формирования микротрубочек (табл. 1).

Межлинейные различия. Анализ результатов показал, что количество генов, экспрессия которых в префронтальной коре мозга крыс OXYS и Вистар различна (при уровне значимости $p < 0,01$), с 5 до 18 мес. увеличивается. Так, в возрасте 5 мес. были выявлены межлинейные различия в экспрессии 923 генов: уровень мРНК 537 генов у крыс OXYS был повышен, а 386 – снижен.

В возрасте 18 мес. количество генов, экспрессия которых в префронтальной коре у крыс OXYS отличалась от таковой у крыс Вистар, достигло 2 103: уровень мРНК у 1 156 генов был повышен, а у 947 – снижен. Таким образом, в возрасте и 5, и 18 мес. у крыс OXYS (см. диаграмму Венна, рис. 1, а) доля генов с повышенным уровнем мРНК была несколько больше, чем со сниженным по сравнению с крысами Вистар (58 и 55 % генов

соответственно). Следует подчеркнуть, что для 309 генов межлинейная разница в уровне экспрессии сохранялась в обеих возрастных группах.

Функциональный анализ обогащения терминами генных онтологий транскриптома префронтальной коры показал, что в возрасте и 5, и 18 мес. у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар повышенный уровень экспрессии генов ассоциирован с изменениями генов, участвующих в ответе на циклические органические соединения, регуляции размера кровеносных сосудов и вазодилатации, ответе на эндогенные стимулы, аутофагии ($< 10^{-5}$; табл. 2). В префронтальной коре у крыс OXYS в возрасте и 5, и 18 мес. среди генов со сниженным уровнем экспрессии выявлены ассоциации с изменениями процессинга фагосомы, эндоцитоза, клеточной адгезии, главного комплекса гистосовместимости ($< 10^{-4}$), каталитической активности, иммунного ответа ($p < 0,0042$) и структурной организации миелиновых волокон ($p = 0,0003$; табл. 2).

Возрастные различия. Всего в возрастной период с 5 до 18 мес. у крыс Вистар изменился уровень мРНК 499 генов: экспрессия 293 генов повысилась, 206 – снизилась (рис. 1, б). У крыс OXYS с возрастом на фоне прогрессии нейродегенеративных процессов изменился уровень мРНК 5 606 генов: экспрессия 2 985 генов повысилась, 2 621 – снизилась. Сравнение списка генов, экспрессия которых с возрастом изменилась однонаправленно в префронтальной коре крыс обеих линий, показало, что у 191 из них она возросла, а у 142 – снизилась (рис. 1, б). В целом такие результаты свидетельствуют о различиях в механизмах и скорости изменений в префронтальной коре при нормальном темпе старения мозга у крыс Вистар и при развитии характерных для БА нейродегенеративных процессов у крыс OXYS. В пользу этого свидетельствуют и результаты сравнения списков генов, дифференциально экспрессирующихся у 18-месячных крыс Вистар и 5-месячных крыс OXYS. Установлено, что уже в 5 мес. у крыс OXYS уровень мРНК 39 генов в префронтальной коре соответствовал уровню ДЭГ с возрастом у 18-месячных крыс Вистар, что свидетельствует об ускоренном старении мозга крыс OXYS. На рис. 2 представлены 15 из 39 генов с наиболее измененной по уровню значимости экспрессией с возрастом у крыс Вистар.

Функциональная характеристика дифференциально экспрессирующихся генов

Возрастные различия. На рис. 3 представлены основные биологические процессы (термины генных онтологий – Gene Ontology), для которых выявлены значимые изменения экспрессии генов в префронтальной коре с возрастом у крыс OXYS и Вистар. Несмотря на то что набор генов, экспрессия которых изменяется с возрастом, у крыс Вистар и OXYS значительно различается, они объединяются в сходные категории генных онтологий. Так, с возрастом в префронтальной коре крыс обеих линий изменяется экспрессия генов, связанных с фосфорилированием, активностью протеинкиназ, нейрогенезом, синаптической пластичностью, воспалением. У крыс Вистар с возрастом снижается экспрессия генов, участвующих в развитии нейрона (*Nrep*, *Slitrk3*, *Lppr4*, *Pvr11*, *Robo2*, *Jak2*, *Robo3*, *Sema3a*, *Olfm3* и *Lamb1*), активности протеинкиназ (*Met*,

Таблица 1. Гены экспрессии в префронтальной коре крыс

Ген	Официальное название	Количество прочтений	Ассоциированная функция
<i>ND5</i>	NADH dehydrogenase subunit 5	2 687 083	Окислительное фосфорилирование
<i>Trnw</i>	tRNA-Trp	1 186 464	Трансляционный посредник
<i>Trnt</i>	tRNA-Thr	280 584	
<i>Calm1</i>	Calmodulin 1	160 924	Связывание ионов кальция
<i>Camk2a</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	131 236	Связывание АТФ
<i>Snap25</i>	Synaptosomal-associated protein 25	82 906	Синаптическая передача
<i>Scd</i>	Stearoyl-CoA desaturase	82 750	Передача нервного импульса
<i>Camk2n1</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	78 087	Синаптическая передача
<i>Trne</i>	tRNA-Glu	73 661	Трансляционный посредник
<i>Zwint</i>	ZW10 interacting kinetochore protein	69 032	Везикулярный транспорт
<i>Bc1</i>	Brain cytoplasmic RNA 1	67 692	Локомоторное поведение
<i>Map1b</i>	Microtubule-associated protein 1B	62 387	Регуляция деполимеризации микротрубочек
<i>Slc1a2</i>	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	59 888	Транспорт нейромедиаторов
<i>Sparcl1</i>	SPARC-like 1	58 972	Связывание ионов кальция
<i>Map2</i>	Microtubule-associated protein 2	58 664	Регуляция деполимеризации микротрубочек
<i>Map1a</i>	Microtubule-associated protein 1A	54 512	
<i>Ywhaz</i>	Tyrosine 3-monooxygenase	53 288	Митохондриальный транспорт
<i>Tomm40</i>	Translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog	51 104	Митохондриальный транспорт
<i>Clstn1</i>	Calsyntenin 1	50 877	Связывание ионов кальция
<i>Sptbn2</i>	Spectrin beta2	50 181	Передача нервного импульса
<i>Atp1a2</i>	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	49 041	Связывание АТФ
<i>Kif5a</i>	Kinesin family member 5A	49 028	Формирование микротрубочек
<i>Nptxr</i>	Neuronal pentraxin receptor	47 960	Связывание ионов кальция
<i>Glul</i>	Glutamate-ammonialigase	46 614	Связывание АТФ
<i>Kif1a</i>	Kinesin family member 1A	45 762	Формирование микротрубочек
<i>Actb</i>	Actin beta	45 335	Связывание АТФ
<i>Sptan1</i>	Spectrin alpha 1	45 315	Организация трансмембранных белков, органелл
<i>Calm3</i>	Calmodulin 3	44 529	Связывание ионов кальция
<i>Atp1a3</i>	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide	43 669	Связывание АТФ
<i>Prkcb</i>	Protein kinase C, beta	43 361	Связывание АТФ

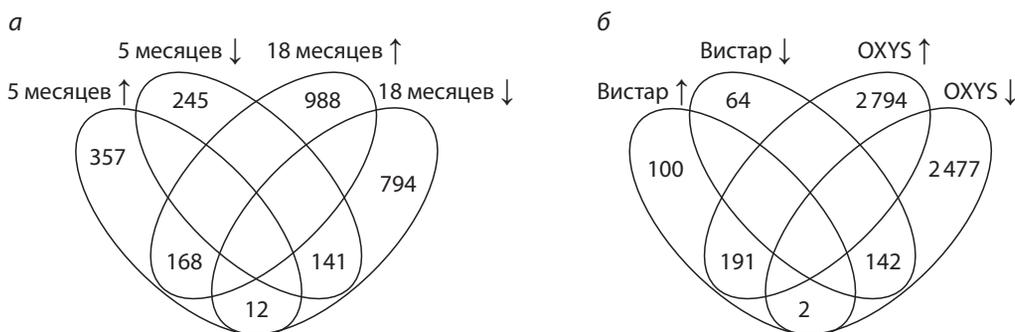


Рис. 1. Диаграммы Венна для дифференциально экспрессирующихся генов.

а – количество генов в префронтальной коре крыс OXYS со сниженным и повышенным по сравнению с крысами Вистар уровнем мРНК в возрасте 5 и 18 мес. и пересечения между группами генов; *б* – количество генов, снизивших и повысивших уровень мРНК с возрастом у крыс OXYS и Вистар, и пересечения между группами генов.

Таблица 2. Обогащение по терминам генных онтологий для групп генов с повышенным и сниженным уровнем экспрессии в префронтальной коре крыс OXYS в возрасте 5 и 18 мес.

Уровень экспрессии			
повышенный		сниженный	
Метаболические пути KEGG, Wikipathways			
WP1305 ($p < 10^{-5}$)	Старение и аутофагия	rno04145 ($p < 10^{-7}$)	Фагосома
rno01110 ($p = 0,0024$)	Метаболические пути	rno04144 ($p < 10^{-6}$)	Эндоцитоз
		rno04514 ($p < 10^{-6}$)	Молекулы клеточной адгезии
Категории генных онтологий, относящихся к биологическим процессам			
GO:0014070 ($p < 10^{-8}$)	Ответ на органические составляющие	GO:0019882 ($p < 10^{-4}$)	Процессинг и презентация антигенов
GO:0050880 ($p < 10^{-6}$)	Регуляция размера кровеносных сосудов	GO:0042611 ($p < 10^{-4}$)	Главный комплекс гистосовместимости
GO:0042311 ($p < 10^{-6}$)	Вазодилатация	GO:0003824 ($p = 0,0005$)	Каталитическая активность
GO:0042311 ($p < 10^{-6}$)	Вазодилатация	GO:0019911 ($p = 0,0003$)	Структурные составляющие миелиновых волокон
GO:0009719 ($p < 10^{-5}$)	Ответ на эндогенные стимулы	GO:0006955 ($p = 0,0042$)	Иммунный ответ

В скобках указан уровень значимости (p) с поправкой Бенджамини – Хохберга.

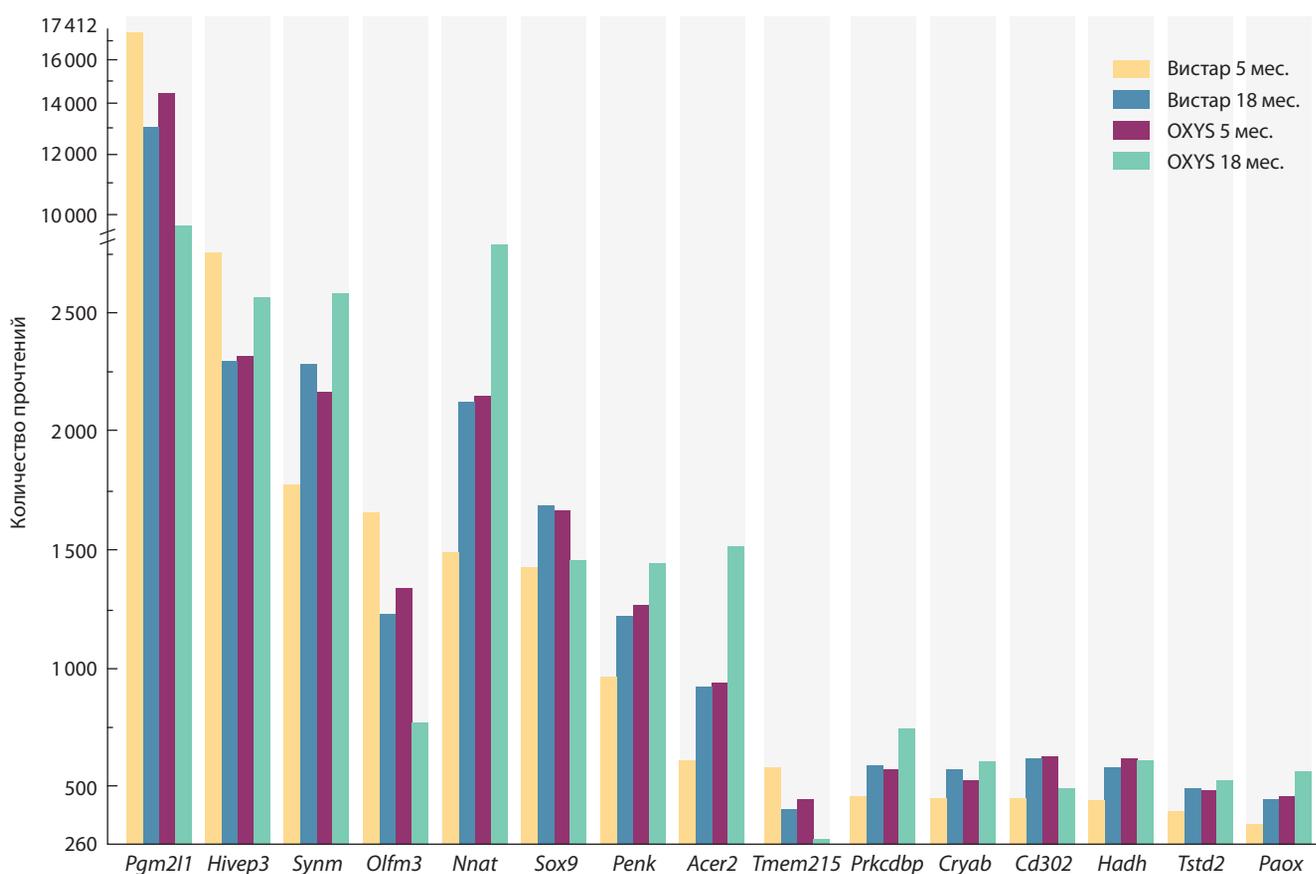


Рис. 2. Гены, уровень мРНК которых у крыс OXYS в возрасте 5 мес. соответствует уровню 18-месячных крыс Вистар.

Kit, Trib2, Epha3, Acvr1c, Ntrk3, Epha5, Epha6, Camk4, Pak3, Mapk14, Jak2, Prkaa2, Camk2a и *Kenh5*). К возрасту 18 мес. у крыс Вистар повышается экспрессия генов, связанных с воспалительным ответом (*Cl1qa, Cyba, Tf, Ass1, Fcgr2b, C4b, C3, Itgb2* и *Mif*), глиогенезом (*Sox10, Gsn,*

Nkx6-2, Nab2, Cspg4 и *Olig2*), ответом на повреждение (*Tf, Gfap, Ass1, Plek, C4b, C3, Cst3, Itgb2, Sparc, Mif, Cl1qa, Cyba, Apod, Fcgr2b* и *Gsn*).

По мере прогрессирования признаков БА у крыс OXYS изменяется экспрессия 122 генов, связанных с развитием

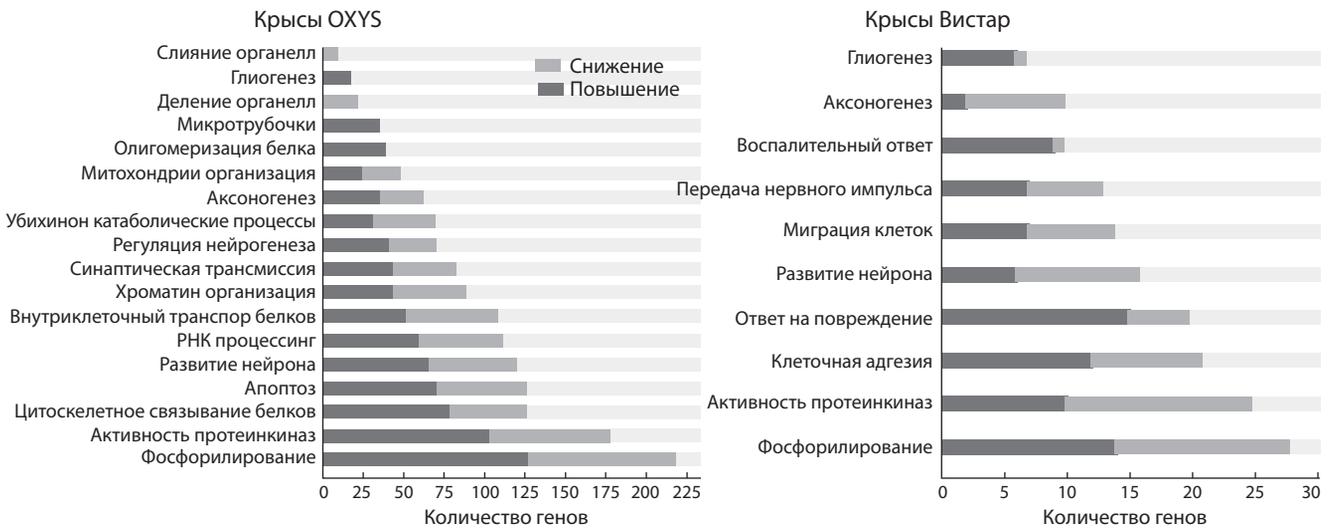


Рис. 3. Значимые категории генных онтологий (GeneOntology), объединяющие гены, экспрессия которых изменяется с возрастом в коре мозга крыс OXYS и Вистар ($p < 0,05$).

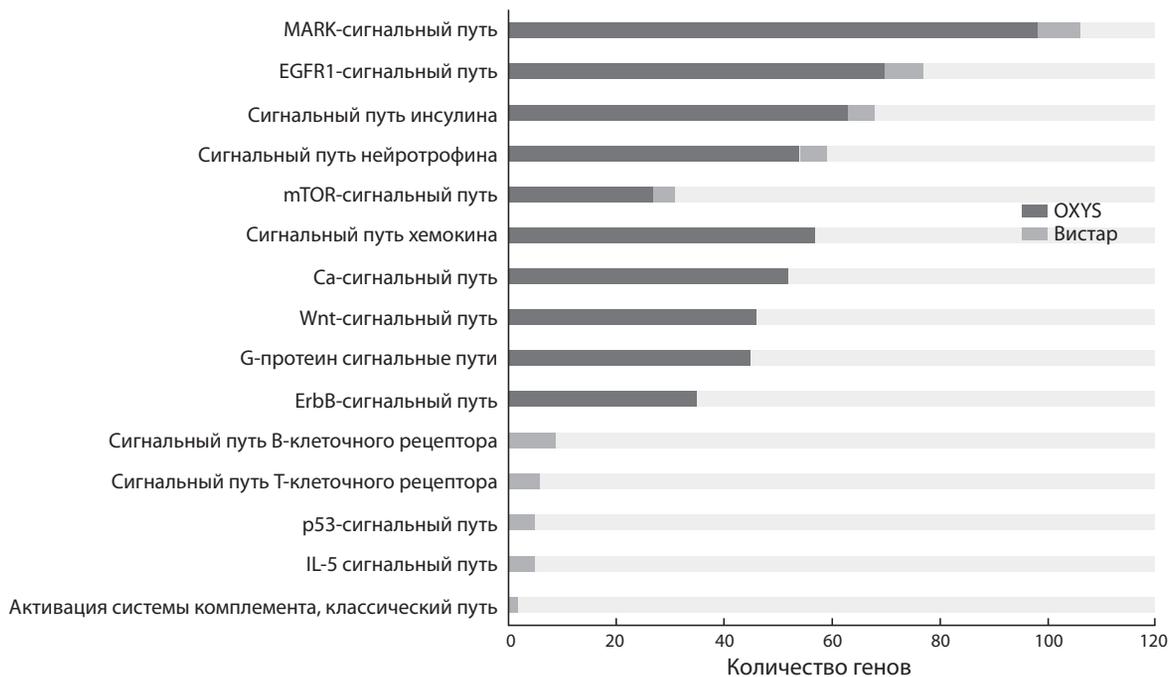


Рис. 4. Сигнальные пути с наиболее значимыми изменениями экспрессии генов с возрастом в коре мозга крыс OXYS и Вистар согласно базам данных KEGGpathway и Wikipathways.

нейрона (*Nrtn*, *Uchl1*, *Cspg4*, *Pip5k1c*, *L1cam*, *Cnp*, *Apod*, *Htra2* и др.), 81 гена – с регуляцией нейрогенеза (*Ache*, *Lzts1*, *Efna3*, *Cspg4*, *Timp2*, *Mif* и др.), 64 генов – с аксоногенезом (*Cck*, *Stk11*, *Uchl1*, *Ephb3*, *Unc5b*, *Unc5a* и др.), 84 генов – с синаптической трансмиссией (*Cltb*, *Cplx1*, *Adora2a*, *Clstn3*, *Syt3*, *Grik4* и др.). Кроме того, изменения экспрессии 220 генов в префронтальной коре у крыс OXYS с возрастом ассоциированы с процессами фосфорилирования (*Cspg4*, *Adora1*, *Map3k4*, *Map3k9*, *Prkaca*, *Map2k7*, *Matk* и др.), 180 генов – с активностью

протеинкиназ (*Itpka*, *Maged1*, *Mark4*, *Grk6*, *Mtor*, *Tnk2*, *Gsk3a* и др.), 110 генов – с внутриклеточным транспортом белков (*Clta*, *Cltb*, *Ap1b1*, *Ap2s1*, *Hps4* и др.), 128 генов – с цитоскелетным связыванием белков (*Maea*, *Hip1r*, *Crocc*, *Vapb*, *Mtss1l*, *Pacsin1* и др.), 50 генов – с организацией митохондрий (*Sept4*, *Oxal1*, *Timm50*, *Timm13*, *Fis1*, *Mrpl12*, *Sharpin*, *Tomm40* и др.), 71 гена – с убихинон-связанными катаболическими процессами (*Uchl1*, *Ube2g2*, *Man1b1*, *Vap1*, *Usp19* и др.). Экспрессия генов, участвующих в делении органелл (*Sept2*, *Pds5b*, *Dnm1l*,

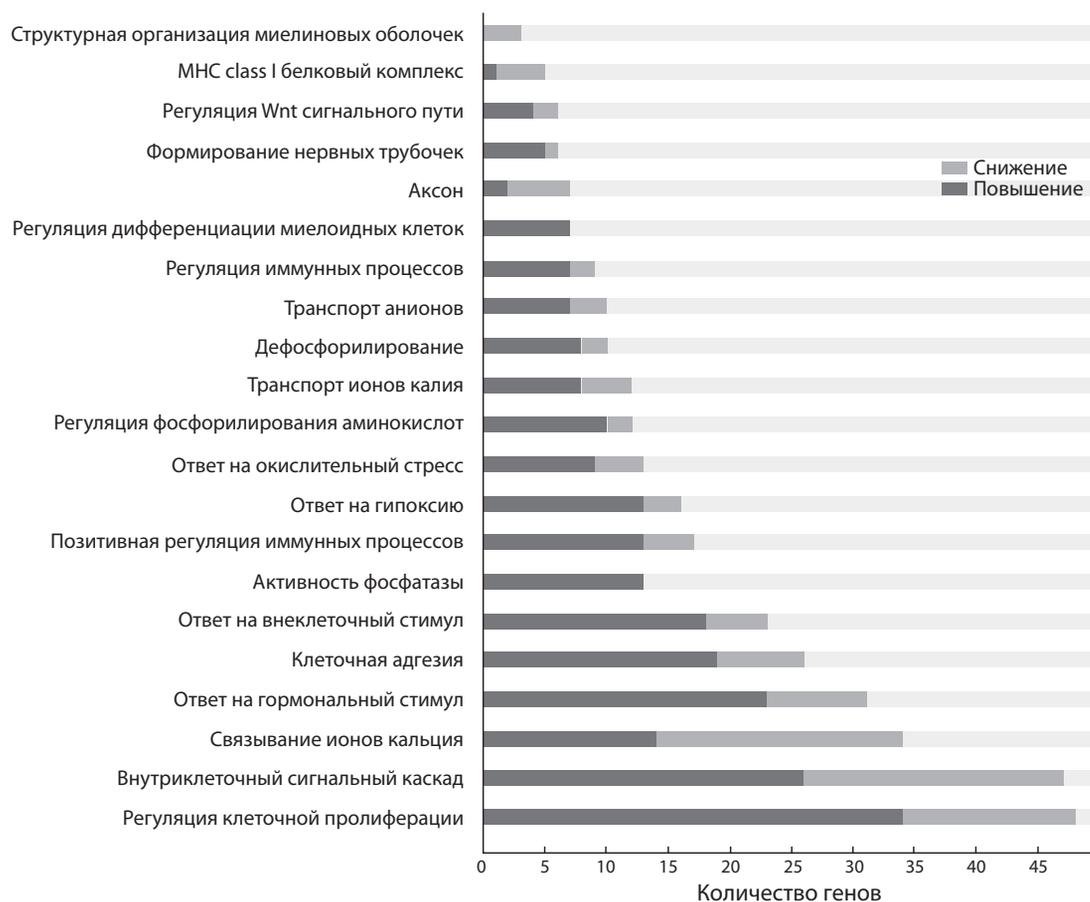


Рис. 5. Значимые категории генных онтологий (GeneOntology), объединяющие межлинейные различия в экспрессии генов в префронтальной коре крыс Вистар и OXYS в возрасте 5 мес. ($p < 0,05$).

Pds5a, *Tmem215*, *Katna1*, *Usp16* и др.) и слиянии органелл (*Mfn1*, *Cav2*, *Vav3*, *Gnai3* и др.), снижается. Повышается экспрессия 35 генов, участвующих в процессах организации микротрубочек (*Kifc2*, *Kif22*, *Spg7*, *Crocc*, *Uchl1*, *Tubb5*, *Tubg1*, *Tubb3* и др.), 39 генов – в олигомеризации белка (*Prkcz*, *Traf2*, *Ache*, *Kcnab2*, *Stk11*, *Aldoc*, *PrkcsH*, *Lnx1*, *Mif* и др.), 17 генов – в глиогенезе (*Sox10*, *Adora2a*, *Cspg4*, *Hdac11*, *Sod1* и др.). Также повышается экспрессия 72 генов, связанных с апоптозом (*Ppard*, *Dedd*, *Fastk*, *Eif5a*, *Casp9*, *Bag3* и др.).

Далее с помощью баз данных KEGGpathway и Wikipathways был проведен анализ ассоциаций групп генов, экспрессия которых изменилась в префронтальной коре животных с возрастом, с сигнальными путями. У крыс обеих линий были выявлены ассоциации с сигнальными путями, контролирующими транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, воспаление, апоптоз и другие процессы (рис. 4). У крыс Вистар наиболее значимые изменения экспрессии генов с возрастом связаны с активацией сигнального пути рецептора В-клеток (*Rps6ka1*, *Card11*, *Zap70*, *Blnk*, *Rps6*, *Fcgr2b*) и Т-клеток (*Cd4*, *Card11*, *Zap70*), IL-5 сигнального пути (*Itgam*, *Rps6ka1*, *Iigb2*), системы комплемента. Общими для крыс обеих линий были изменения экспрессии генов, связанных с MAPK-, инсулин-, нейротрофин-, EGFR1-

и mTOR-сигнальными путями, однако представленность генов и масштабы их изменений были значительно выше у крыс OXYS (рис. 4). С возрастом у них существенно изменилась экспрессия генов, ассоциированных с G-protein-, EGFR1-, chemokine-, ErbB-, Wnt- и calcium-зависимыми сигнальными путями (рис. 4), что характерно и для больных БА (Winkler, Fox, 2013).

Межлинейные различия. На рис. 5 и 6 представлены основные биологические процессы (термины генных онтологий, GeneOntology), для которых выявлены значимые изменения экспрессии генов в префронтальной коре в период развития (возраст 5 мес.) и в период активной прогрессии (возраст 18 мес.) признаков БА у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар.

Анализ специфичных для возраста 5 мес. ДЭГ показал, что на ранней стадии развития признаков БА у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар изменена экспрессия генов, участвующих в регуляции клеточной пролиферации, внутриклеточных сигнальных каскадов.

Экспрессия генов Wnt-зависимого сигнального пути, ответа на внеклеточный стимул, фосфатазной активности, ответа на окислительный стресс, регуляции фосфорилирования аминокислот, дефосфорилирования, транспорта анионов и ионов калия, дифференциации миелоидных клеток, регуляции иммунных процессов повышена.

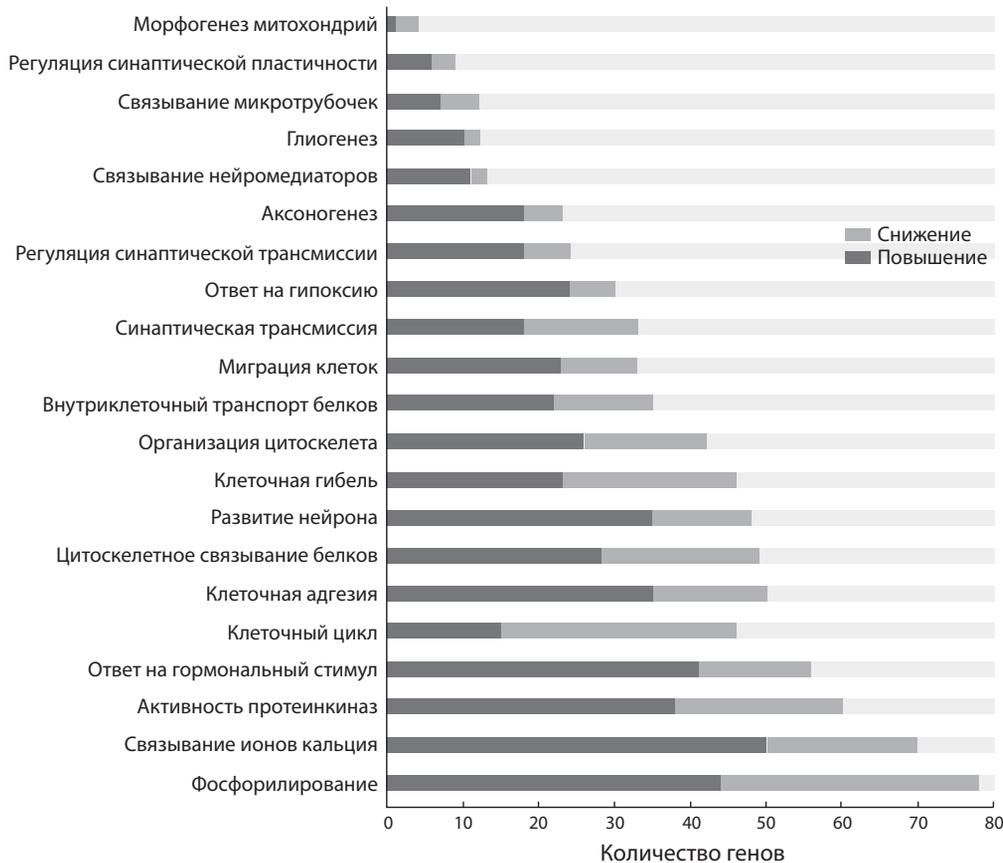


Рис. 6. Значимые категории генных онтологий (GeneOntology), объединяющие межлинейные различия в экспрессии генов в префронтальной коре крыс Вистар и OXYS в возрасте 18 мес. ($p < 0,05$).

В возрасте 5 мес. у крыс OXYS снижена экспрессия генов, участвующих в организации миелиновых оболочек (*Crocc*, *Haus1*, *Nefh*, *Cnp*, *Tubgcp2*), при этом повышена регуляция формирования микротрубочек (*P2rx4*, *Adora2b*, *Agt*, *Pde5a*, *Gucyl1a3*). И в 5, и в 18 мес. у крыс OXYS повышена экспрессия генов ответа на гипоксию, клеточной адгезии, связывания ионов кальция, ответа на гормональный стимул. Для крыс OXYS обоих возрастных периодов также характерно изменение экспрессии генов, ассоциированных с аксоногенезом. В возрасте 18 мес. гены с повышенной экспрессией группируются у них в категории (термины генных онтологий): развитие нейрона (*Fgfr1*, *Pip5k1c*, *Grin3a*, *Ephb2*, *Lingo1* и др.), организация цитоскелета (*Fgd1*, *Ablim2*, *Pdlim7*, *Bcar1*, *Srf*, *Ptk2b*, *Obsl1* и др.), внутриклеточный транспорт белков (*Ramp3*, *Aspscr1*, *Ap1m1*, *Ipo13*, *Hps4*, *Pml*, *Cacnb1* и др.), миграция клеток (*Plat*, *Ppard*, *Efnb1*, *Bcar1*, *Iga3*, *Pf4*, *Kit*, *Mmp14* и др.), регуляция синаптической трансмиссии (*Plat*, *Sncg*, *Ncdn*, *Gnai2*, *Grik5* и др.), связывание нейромедиаторов (*Kiss1r*, *Chrm4*, *Grin2b*, *Chrm3*, *Chrm1*, *Chrn2*, *Grin3b*, *Grin3a* и др.), глиогенез (*Ascl1*, *Ptk2b*, *Agt*, *Nab2*, *Phgdh*, *Reln*, *C1s*, *Mmp14*, *Eif2b1* и *Smarca4*). У крыс OXYS изменена экспрессия генов, участвующих в фосфорилировании, цитоскелетном связывании белков, апоптозе. Экспрессия генов, связанных с клеточным циклом (*Nbn*, *Tmem215*, *Haus1*, *Cdc73*, *Ceng1*, *Zkscan5*, *Katna1*, *Npm1*,

Usp16 и др.) и морфогенезом митохондрий (*Mfn2*, *Mfn1* и *Col4a3bp*), снижена.

Обсуждение

Выясняя природу развития признаков БА у крыс OXYS, мы исследовали транскриптом префронтальной коры их мозга в возрасте 5 и 18 мес., в период активной манифестации и усиленной прогрессии признаков заболевания. Анализ результатов показал, что в возрасте 5 мес. в префронтальной коре крыс OXYS изменен уровень мРНК более 900 генов, а в 18 мес. – уже более 2000 генов по сравнению с одновозрастными крысами Вистар. Их основная часть и в 5, и в 18 мес. связана с изменениями экспрессии генов, продукты которых участвуют в процессах нейрональной пластичности, иммунной системы и апоптоза, ассоциированы с фосфорилированием белков, гипоксией, Ca^{2+} гомеостазом.

Уровень мРНК генов из функциональных категорий «синапс», «синаптическая трансмиссия», «аксоногенез», «регуляция синаптической пластичности» в префронтальной коре крыс OXYS в возрасте 5 мес. был снижен, а в возрасте 18 мес. – повышен. Прогрессирующее снижение уровня синапсина 1, участвующего в регуляции процесса выброса нейромедиаторов в синапсах, и PSD-95, важного звена в регуляции синаптической пластичности, в мозге больных БА рассматриваются как маркерные события

(Scheff et al., 2014). В префронтальной коре крыс Вистар и OXYS в возрасте 5 мес. мы не выявили межлинейных различий в уровне мРНК гена *Dlg4*, кодирующего PSD-95, и гена *Syn1*, кодирующего синапсин I, но в возрасте 18 мес. у крыс OXYS он был повышен. Ранее мы показали, что уровень белковых продуктов этих генов – PSD-95 и синапсина I – в префронтальной коре крыс OXYS и Вистар в 4 мес. также не различается, но в гиппокампе крыс OXYS – уже снижен. С возрастом уровень пре- и постсинаптических белков закономерно снижается в мозге крыс обеих линий, но у крыс OXYS – ускоренными темпами. В результате у крыс OXYS в возрасте 18 мес. уровень PSD-95 и синапсина I был ниже в обеих структурах мозга (Stefanova et al., 2015a).

С возрастом у крыс OXYS изменяется экспрессия более 5 500 генов, у крыс Вистар – только 499 генов. Большинство из них связано с фосфорилированием, активностью протеинкиназ, нейрогенезом, синаптической пластичностью и иммунной системой. Уровень мРНК более 120 генов из функциональных категорий «нейрон», «развитие нейрона» и «регуляция нейрогенеза» в префронтальной коре крыс OXYS изменялся с возрастом. Важную роль в развитии мозга играют протеоглики – гепарансульфаты и гепарансульфатпротеоглики (Maeda et al., 2011). Гепарансульфаты участвуют в модулировании синаптической пластичности, влияют на формирование структур мозга и его размеры. Экспрессия гепарансульфатпротеогликов динамично регулируется различными физиологическими стимулами, в том числе нейрональной активностью. Ранее нами установлено, что окончание формирования мозга крыс OXYS в ранний постнатальный период происходит на фоне изменения состава и содержания протеогликов (Rukova et al., 2011). Также обнаружено, что у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар становление и окончание формирования мозга (оно завершается к возрасту 20 дней) происходит на фоне значительного повышения экспрессии генов ферментов синтеза (*Ext1* и *Ext2*) и деградации (*Hpse* – гепараназы) протеогликов (Шевелев и др., 2012). С возрастом их уровень в мозге крыс OXYS и Вистар закономерно снижался и межлинейные различия нивелировались. Анализ результатов исследования транскриптома не выявил межлинейных различий в уровне мРНК генов *Ext1*, *Ext2*, а также их лигандов *Extl1* и *Extl2* в возрасте 5 мес. в префронтальной коре мозга. К возрасту 18 мес. уровень мРНК гена *Extl2* снизился у крыс обеих линий, а уровень мРНК генов *Ext1*, *Ext2* и *Extl1*, напротив, повысился, но только у крыс OXYS. При этом и в 5, и в 18 мес. в коре мозга крыс OXYS практически вдвое был снижен уровень мРНК гена *Hpse*, фермента деградации гепарансульфатов.

Согласно современным представлениям, патологическое накопление Аβ, очевидно, обусловлено не столько гиперпродукцией APP, сколько дисбалансом между продукцией и клиренсом Аβ (Mawuenyega et al., 2010). Недавно нами показано, что содержание Аβ в гиппокампе крыс OXYS с возраста 3 до 23 мес. увеличивается втрое (Stefanova et al., 2015a). Усиленное накопление с возрастом Аβ в мозге крыс OXYS наряду с повышением уровня мРНК *App* и содержания APP, вероятно, связано с нарушением процессов деградации. Косвенно на это

указывают изменения экспрессии генов, участвующих в процессах деградации (*Mme*) и агрегации Аβ (*Lpl*, *Lrp1*). Снижение уровня неприлизина, мембранной металло-эндопептидазы (ММЕ), фермента, кодируемого *MME*, становится причиной накопления Аβ в мозге (Kanemitsu et al., 2003). Как показали результаты исследования транскриптома, уровень мРНК гена *Mme* в префронтальной коре мозга крыс OXYS и Вистар не различался между линиями в возрасте 5 мес. и снижался с возрастом у крыс OXYS. Не менее важным, чем накопление Аβ, признаком развития БА у крыс OXYS становятся повышение уровня тау-белка и его усиленное фосфорилирование (Stefanova et al., 2014a, b2015a). Нейротоксическое действие тау-белка может быть опосредовано Аβ, который стимулирует белок к усиленному фосфорилированию и, соответственно, образованию нейрофибриллярных клубков через активацию киназ *Cdk5* и *GSK3b*, а также путем активации каспазы 3, каспазы 9 и кальпаина (Chung et al., 2001; Cho, Johnson, 2004). Анализ транскриптома префронтальной коры показал, что прогрессия признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне снижения уровня мРНК гена *Gsk3b* и повышения уровня мРНК генов *Cdk5*, *Casp9* и *Capn1*, которое могло быть следствием активации токсическими формами Аβ нейродегенеративных процессов.

Предполагается, что системный иммунный дисбаланс может создавать определенный метаболический фон для развития и прогрессии многих проявлений преждевременного старения крыс OXYS, включая признаки БА. Межлинейные различия в профилях экспрессии генов иммунной системы как в префронтальной коре, так и в сетчатке (Kozhevnikova et al., 2013) отражают ее состояние у крыс OXYS, которое можно охарактеризовать как неполноценное воспаление. Манифестация первых признаков БА, как и других проявлений преждевременного старения, происходит у крыс OXYS в период завершения полового созревания и начала инволюции тимуса (Obukhova et al., 2009). При этом ускоренная инволюция тимуса крыс OXYS, очевидно, становится причиной снижения активности Т-клеточного звена иммунной системы (Markova et al., 2003). В комплексе с результатами анализа транскриптома это позволяет рассматривать ускоренное иммуностарение как одну из вероятных причин преждевременного старения крыс OXYS, механизмы которого еще предстоит изучить.

Проведенное исследование показало, что развитие признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне изменения транскриптома префронтальной коры мозга – экспрессии генов, продукты которых участвуют в процессах нейрональной пластичности, иммунной системы и апоптоза, ассоциированы с фосфорилированием белков, гипоксией, Ca^{2+} гомеостазом. Мы надеемся, что исследования на крысах OXYS позволят получить новые знания о молекулярно-генетических предпосылках развития заболевания и проводить поиск потенциальных молекулярных мишеней для направленных на профилактику и, возможно, лечение БА терапевтических воздействий.

Благодарности

Работа выполнена в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005

и RFMEFI62114X0010), а также поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН VI.53.2.4, грантом Правительства Российской Федерации 14.B25.31.0033 и грантами РФФИ (15-04-01938 и 15-04-06066).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Береговой Н.А., Сорокина Н.С., Старостина М.В., Колосова Н.Г. Возрастные особенности формирования длительной посттетанической потенциации у крыс линии OXYS. Бюл. эксперим. биол. мед. 2011;151(1):82-86.
- Колосова Н.Г., Акулов А.Е., Стефанова Н.А., Мошкин М.П., Савелов А.А., Коптгов И.В., Панов А.В., Вавилин В.А. Влияние малата на развитие индуцированных ротоном изменений мозга у крыс Вистар и OXYS: МРТ исследование. Докл. АН. 2011;437(2):273-276.
- Колосова Н.Г., Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Фурсова А.Ж., Кожевникова О.С. Крысы OXYS – генетическая модель преждевременного старения и связанных с ним заболеваний. Усп. геронтологии. 2014;27(2):336-340.
- Шевелев О.Б., Рыкова В.И., Федосеева Л.А., Леберфарб Е.Ю., Дымшиц Г.М., Колосова Н.Г. Экспрессия *Ext1*, *Ext2* и гепараназы в мозге преждевременно стареющих крыс OXYS в период раннего онтогенеза и развития нейродегенеративных изменений. *Biochemistry (Moscow)*. 2012;77(1):71-78.
- Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010;11(10):R106. DOI: 10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Bertram L., McQueen M.B., Mullin K., Blacker D., Tanzi R.E. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* 2007;39(1):17-23.
- Cho J.H., Johnson G.V. Glycogen synthase kinase 3 beta induces caspase-cleaved tau aggregation *in situ*. *J. Biol. Chem.* 2004;279(52):54716-54723.
- Chung C.W., Song Y.H., Kim I.K., Yoon W.J., Ryu B.R., Jo D.G., Woo H.N., Kwon Y.K., Kim H.H., Gwag B.J., Mook-Jung I.H., Jung Y.K. Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol Dis.* 2001;8(1):162-172.
- Kanemitsu H., Tomiyama T., Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett.* 2003;350(2):113-116.
- Kolosova N.G., Stefanova N.A., Sergeeva S.V. OXYS rats: a prospective model for evaluation of antioxidant availability in prevention and therapy of accelerated aging and age-related cognitive decline. Eds Q. Gariépy, R. Ménard. *Handbook of Cognitive Aging: Causes, Processes*. N.Y.: Nova Sci. Publ., 2009.
- Korboлина E.E., Kozhevnikova O.S., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Quantitative trait loci on chromosome 1 for cataract and AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(1):49-59.
- Kozhevnikova O.S., Korboлина E.E., Ershov N.I., Kolosova N.G. Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy. *Cell Cycle*. 2013;12(11):1745-1761. DOI: 10.4161/cc.24825
- Krstic D., Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2013;9(1):25-34. DOI: 10.1038/nrneuro.2012.236
- Maeda N., Ishii M., Nishimura K., Kamimura K. Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem. Res.* 2011;36(7):1228-1240. DOI: 10.1007/s11064-010-0324-y
- Markova E.V., Obukhova L.A., Kolosova N.G. Parameters of cell immune response in Wistar and OXYS rats and their behavior in the open field test. *Bul. Exp. Biol. Med.* 2003;136(6):588-590.
- Mawuenyega K.G., Sigurdson W., Ovod V., Munsell L., Kasten T., Morris J.C., Yarasheski K.E., Bateman R.J. Decreased clearance of CNS beta-Amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010;330(6012):1774. DOI: 10.1126/science.1197623
- Morley J.E., Armbrecht H.J., Farr S.A., Kumar V.B. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys Acta*. 2012;1822(5):650-656. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.11.015
- Obukhova L.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats. *Aging (Albany N.Y.)*. 2009;1(4):389-401.
- Rykova V.I., Leberfarb E.Y., Stefanova N.A., Shevelev O.B., Dymshits G.M., Kolosova N.G. Brain proteoglycans in postnatal development and during behavior decline in senescence-accelerated OXYS rats. *Adv. Gerontol.* 2011;24(2):234-243.
- Querfurth H.W., LaFerla F.M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 2010;362(4):329-344. DOI: 10.1056/NEJMra0909142
- Scheff S.W., Neltner J.H., Nelson P.T. Is synaptic loss a unique hallmark of Alzheimer's disease? *Biochem. Pharmacol.* 2014;88(4):517-528. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.12.028
- Shimohara M., Fujioka S., Murray M.E., Wojtas A., Baker M., Rovelet-Lecrux A., Rademakers R., Das P., Parisi J.E., Graff-Radford N.R., Petersen R.C., Dickson D.W., Bu G. Regional distribution of synaptic markers and APP correlate with distinct clinicopathological features in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Brain*. 2014;137(Pt 5):1533-1549. DOI: 10.1093/brain/awu046
- Stefanova N.A., Fursova A., Kolosova N.G. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats. *J. Alzheimers Dis.* 2010;21(2):479-491. DOI: 10.3233/JAD-2010-091675
- Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., Korboлина E.E., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Senescence-accelerated OXYS rats: A model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. *Cell Cycle*. 2014a;13(6):898-909. DOI: 10.4161/cc.28255
- Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Kiseleva E., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology. *J. Pineal Res.* 2015b;59(2):163-177. DOI: 10.1111/jpi.12248
- Stefanova N.A., Muraleva N.A., Korboлина E.E., Kiseleva E., Maksimova K.Y., Kolosova N.G. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats. *Oncotarget*. 2015a;6(3):1396-1413.
- Stefanova N.A., Muraleva N.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1. *J. Alzheimers Dis.* 2014b;38(3):681-694. DOI: 10.3233/JAD-131034
- Trapnell C., Pachter L., Salzberg S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 2009;25(9):1105-1111. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp120
- Winkler J.M., Fox H.S. Transcriptome meta-analysis reveals a central role for sex steroids in the degeneration of hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *BMC Syst. Biol.* 2013;7:51. DOI: 10.1186/1752-0509-7-51

Стресс и артериальная гипертензия: крысы линии НИСАГ (ISIAH)

Е.В. Антонов¹, Ю.В. Александрович¹, А.А. Серяпина¹, Л.О. Климов¹, А.Л. Маркель^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

В кратком обзоре изложены взгляды на проблему стресса и артериальной гипертензии. Известно, что стресс является одним из существенных факторов риска заболеваний сердечно-сосудистой системы. Повышение артериального давления – типичное проявление острой стрессовой реакции. В связи с этим существует гипотеза о том, что состояние хронического стресса может быть причиной развития гипертонической болезни. Имеется несколько работ, в которых описано наличие ассоциации артериальной гипертензии с психологическим стрессом у людей. Показано, что артериальной гипертензии сопутствует повышение тонуса симпатической нервной системы. Но, с другой стороны, есть много популяционных работ, в которых не было обнаружено ассоциаций между разными видами хронического стресса и гипертензией. Таким образом, вопрос остается далеким от разрешения. Даже в тех случаях, когда удавалось получить заметный гипертензивный эффект в экспериментальных работах с применением эмоционального стресса, возникали трудности с объяснением механизмов формирования стресс-индуцированной гипертензии. Для прояснения ситуации одним из авторов данной статьи была начата селекция крыс на повышенную реакцию артериального давления при действии эмоционального стресса, в результате чего была получена инбредная линия крыс со стойкой стресс-индуцированной артериальной гипертензией. В обзоре приведена краткая история создания генетической модели стресс-индуцированной артериальной гипертензии – линии крыс НИСАГ (ISIAH). Дан ретроспективный обзор основных исследований, проведенных на крысах линии НИСАГ, в которых показана роль генетически обусловленных особенностей функционирования главных систем нейроэндокринной регуляции стресса и артериального давления в формировании гипертензивного статуса у крыс линии НИСАГ.

Ключевые слова: стресс; артериальная гипертензия; крысы линии НИСАГ.

Stress and arterial hypertension: ISIAH rat strain

Ye.V. Antonov¹, Yu.V. Alexandrovich¹, A.A. Seryapina¹, L.O. Klimov¹, A.L. Markel^{1,2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The main views of the issue of stress and hypertension are briefly reviewed. It is well known that stress is one of the major risk factors for cardiovascular disease development. Increase in blood pressure is a typical manifestation of the acute stress response. This fact is the reason to hypothesize that chronic stress causes the development of hypertensive disease. An association of hypertension with psychological stress in humans was shown in several works. In addition, it was demonstrated that hypertension was accompanied by an increase in sympathetic tone. On the other hand, there were many population studies in which no association was found between different types of chronic stress and arterial hypertension. Thus, the question is far from being resolved. Even in cases when one managed to obtain a significant hypertensive effect in experimental studies with emotional stress, it was difficult to explain the mechanisms mediating the formation of stress-induced hypertension. To clarify the situation, one of the authors of this review decided to begin the breeding of a rat strain with increased blood pressure response to emotional stress. This breeding gave rise to inbred rats with persistent stress-induced arterial hypertension. The short history of development of the genetic model of stress-induced arterial hypertension, the ISIAH rat strain, is given. A retrospective review of the studies performed with ISIAH rats is presented. The contribution of genotype changes in the neuroendocrine systems involved in stress and blood pressure regulation to the development of stress-dependent hypertension in the ISIAH rat strain is shown.

Key words: stress; arterial hypertension; ISIAH rat strain.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Антонов Е.В., Александрович Ю.В., Серяпина А.А., Климов Л.О., Маркель А.Л. Стресс и артериальная гипертензия: крысы линии НИСАГ (ISIAH). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):455-459. DOI 10.18699/VJ15.060

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Antonov Ye.V., Alexandrovich Yu.V., Seryapina A.A., Klimov L.O., Markel A.L. Stress and arterial hypertension: ISIAH rat strain. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4): 455-459. DOI 10.18699/VJ15.060

DOI 10.18699/VJ15.060

УДК 575.174.015.3. 616.12-008.331.1

Поступила в редакцию 11.07.2015 г.

Принята к публикации 27.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: markel@bionet.nsc.ru

Болезни сердечно-сосудистой системы, такие как ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия и инсульт, ответственны за 33 % смертей, зарегистрированных в США в 2008 г. (Roger et al., 2012). Существует устойчивое представление о том, что стресс является одним из существенных факторов риска и даже патогенетическим механизмом в развитии сердечно-сосудистой патологии, в частности гипертонической болезни. Транзиторное повышение артериального давления (АД) является типичным проявлением острой стрессовой реакции. В связи с этим существует гипотеза о том, что состояние хронического стресса может способствовать развитию стойкого гипертензивного состояния (Spartenberger et al., 2009). Так, имеется несколько работ, в которых показано наличие ассоциации артериальной гипертензии с психологическим стрессом, развивающимся у одиноких людей (Caspi et al., 2006; Hawkey et al., 2006, 2010; Shankar et al., 2011).

Известно, что психоэмоциональный стресс, связанный с посещением врача, приводит к тому, что показатели АД, измеренные врачом, значительно превышают показатели, получаемые при измерении в привычной домашней обстановке (гипертония «белого халата») (Pickering et al., 1988). Правда, в этом случае мы наблюдаем эффекты острого эмоционального стресса, которые быстро прекращаются после окончания визита к врачу, хотя некоторые авторы полагают, что неоднократное повторение состояний острого стресса сходно хроническому и может приводить к стойкой гипертензии (Fredrikson, Matthews, 1990; Chida, Steptoe, 2010).

Наряду с этим показано, что артериальной гипертензии сопутствует повышение тонууса симпатической нервной системы, а, как известно, к повышению симпатической активности приводит именно стресс. У людей, больных гипертонической болезнью, в крови, оттекающей от таких органов, как головной мозг и сердце, увеличено содержание норадреналина и продуктов его метаболизма (Grassi, 2009; Esler, 2010). Также известно, что симпатическая денервация почки успешно используется для лечения больных с резистентной гипертензией (Esler et al., 2010). Но, с другой стороны, есть много популяционных работ, в которых не было обнаружено ассоциаций между разными видами хронического стресса и гипертензией (Kahn et al., 1972; Cozier et al., 2006; Kivimeaki et al., 2007; Trudel et al., 2010).

Экспериментальная проверка роли стресса в патогенезе артериальной гипертензии проведена в ранних работах Дж. Генри с соавт. (Henry et al., 1975), в которых было показано, что социальный стресс у крыс и мышей сопровождается стойким повышением АД. В то же время С. Харрап с соавт. (Harrap et al., 1984) не удалось индуцировать стойкую артериальную гипертензию у крыс, подвергая их действию психосоциального стресса. С того времени было выполнено главным образом на крысах довольно много экспериментальных исследований, имеющих целью выяснение связи между стрессом и формированием артериальной гипертензии. Так, в обзорной статье Е. Наливайко из Биомедицинской школы Университета Ньюкасла (Австралия) приведен список из 37 таких публикаций (Nalivaiko, 2011). В этих работах использовались разные виды хронического стресса, такие как

увеличение числа особей в клетке, постоянное нарушение иерархии, болевые раздражения и т. д., причем в качестве испытуемых использованы крысы разных линий, в том числе и гипертензивных линий SHR, DS, BHR (borderline hypertensive rats). В итоге в 21 из 37 случаев авторам удалось добиться продолжительного повышения АД, но в 16 экспериментах стрессирование крыс не приводило к развитию гипертензии.

Таким образом, вопрос остается далеким от разрешения. Как пишет в заключении своего обзора Е. Наливайко: «More than three decades of intense research efforts have not brought about clarity to the most crucial issue in modelling psychogenic hypertension: whether chronic stress can provoke a sustained increase in arterial pressure in laboratory animals» (Nalivaiko, 2011. P. 115). Более того, даже в тех случаях, когда авторам удавалось получить заметный гипертензивный эффект, возникали трудности с объяснением механизмов формирования стресс-индуцированной гипертензии.

Испытывая давний интерес к этой проблеме и теша себя тщеславными надеждами, один из авторов данной статьи в середине 70-х годов прошлого века затеял эксперимент, который, казалось бы, мог значительно прояснить ситуацию. В самом деле, почему в одних экспериментах удается в условиях стресса воспроизвести стойкую гипертензию, а в других нет? Конечно, приходят соображения о роли генетической предрасположенности. Стрессовое воздействие для формирования гипертензивного статуса должно встретиться с организмом, генетически предрасположенным к гипертензивным реакциям. Поэтому решено было начать селекцию крыс на повышенную реакцию АД при действии эмоционального стресса. В качестве исходной популяции служили аутбредные крысы линии Вистар, разводимые в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН. Систолическое артериальное давление измеряли на хвосте общепринятым при работе с крысами и мышами непрямым методом (tail-cuff method). Для исключения влияния на величины АД самой процедуры измерения, которая предусматривает иммобилизацию крысы в рестрикционной камере, так называемое базальное АД измеряли у крыс, наркотизированных эфиром (рауш-наркоз). Такой кратковременный (5–6 мин) наркоз позволял провести несколько измерений АД у одной находящейся в «покое» крысы. Затем через несколько дней производили оценку реакции АД на эмоциональный стресс.

В качестве стрессирующего воздействия применяли получасовую рестрикцию крысы в клетке из проволочной сетки, по окончании которой делали несколько измерений АД, в данном случае у ненаркотизированных крыс. Таким образом, для каждой крысы получали две характеристики базального и индуцированного стрессом уровней АД. Первоначальный план селекции предусматривал отбор для размножения крыс, у которых базальные величины АД находятся в пределах среднепопуляционного уровня, а повышение АД под влиянием стресса превышало бы таковой. У отобранных для скрининга АД 283 крыс Вистар, самцов и самок, средний уровень базального АД составлял 118 мм рт. ст. ($\sigma = 17$), при этом лишь у 5 особей (1,7 %) базальный уровень превышал условную границу в 150 мм рт. ст., и все они были самцами.

Рестрикционный стресс приводил к расширению и уплощению кривой распределения крыс по уровню АД, средняя величина которого выросла до 127 мм рт. ст. ($\sigma = 26$), и условную границу в 150 мм рт. ст. перешли уже 54 крысы (19,1 %), как самцы, так и самки, что позволило приступить к дальнейшему скрещиванию крыс с повышенной стресс-чувствительностью по величине АД. Селекция фактически проходила в три этапа. Родоначальниками послужили 12 пар самцов и самок, выбранных из исходной популяции крыс Вистар. На первом этапе селекции на протяжении 17 поколений избегали близкородственных скрещиваний. Затем в скрещиваниях стали участвовать особи из близкородственных семей (13 селекционных поколений) и, наконец, на протяжении последующих 30 поколений был осуществлен тесный братско-сестринский инбридинг. В результате была получена высокоинбредная линия крыс, получившая наименование НИСАГ (наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертония) (Маркель, 1985; Адаричев и др., 1996), или ISIAH (inherited stress-induced arterial hypertension) – под таким именем линия упоминается в англоязычной литературе и зафиксирована в базе RGD, ID 2292168 (Markel, 1992; Markel et al., 1999). В настоящее время линия крыс НИСАГ прошла процедуру редеривации, получила SPF-статус и содержится в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН. Средние величины АД, измеренные у крыс НИСАГ за три последних года, составляют 165–175 мм рт. ст. в покое (базальное АД) и 190–200 мм рт. ст. при действии стресса.

Неожиданным эффектом селекции на повышение АД при стрессе стало увеличение по мере продолжения отбора также и базального АД. Рассматривались разные варианты объяснения этого феномена. В свое время была использована описанная К. Уоддингтоном (Waddington, 1961) возможность так называемой «генетической ассимиляции признака», когда длительная селекция по признаку, проявлявшемуся в условиях стресса, приводит к тому, что этот признак начинает проявляться и в отсутствие стресса. С другой стороны, можно думать, что усиление в результате селекции стресс-реактивности приводит к тому, что условия обычного «виварского существования» начинают восприниматься в определенной степени как стрессирующие со всеми вытекающими для АД последствиями. Но тем не менее очевидно, что величины базального и стресс-индуцированного уровней АД частично сцеплены как на генетическом, так и на физиологическом уровнях.

Итак, последующая работа была направлена на выяснение генетико-физиологических механизмов формирования стресс-индуцированного гипертензивного состояния у крыс линии НИСАГ. В данном обзоре остановимся на выяснении существенного вопроса: как в результате селекции у крыс НИСАГ изменилась стресс-реактивность и каким образом ее изменение может быть сопряжено с развитием артериальной гипертонии. Стресс-реактивность у крыс НИСАГ изучена как на поведенческом, так и на нейроэндокринном уровнях реагирования.

Поведенческие реакции крыс НИСАГ и Вистар были исследованы в нескольких работах (Маркель, 1986; Маркель и др., 1988; Мешков и др., 2012). Получены данные по сравнительному анализу поведения в тесте открытого поля гипертензивных крыс SHR (Spontaneously hyper-

tensive rats, Япония), НИСАГ и нормотензивных Вистар. Крысы линии SHR отличаются повышенной спонтанной двигательной активностью, в то время как крысы НИСАГ характеризуются повышенной поведенческой реактивностью, которая определяется как отношение общей двигательной активности в первом тесте к активности в последнем, четвертом, тесте открытого поля после адаптации к условиям процедуры. Эта величина у крыс НИСАГ составила 4,76, она была значительно меньше и практически одинаковой у крыс SHR (1,73) и Вистар (1,72). Интересно, что у крыс SHR повышена именно спонтанная двигательная активность, и они являются спонтанно гипертензивными, в то время как у крыс НИСАГ повышена поведенческая реактивность, и их гипертония также является стресс-«реактивной». Такой параллелизм поведения и АД свидетельствует о значительной роли центральных мозговых механизмов в патогенезе разных типов гипертонии. Следует также отметить, что повышенная поведенческая реактивность крыс НИСАГ связана, скорее, не со страхом «новизны», а с вызванной новизной исследовательской активностью, что было показано также в недавно опубликованной работе (Мешков и др., 2012).

Особенности поведения крыс НИСАГ ассоциированы с изменениями нейромедиаторных систем регуляции. Это касается концентраций таких нейромедиаторов, как норадреналин, дофамин и серотонин в различных отделах мозга (Markel et al., 1987, 1999). Была обнаружена корреляция между уровнем альфа-1-адренорецепторов в стволе мозга и величиной АД у крыс гибридной популяции F₂, полученной при скрещивании крыс НИСАГ и WAG (Маркель, Шишкина, 1992). В свое время была даже предпринята безуспешная попытка коррекции гипертонии у крыс НИСАГ путем введения предшественника дофамина и норадреналина, способного преодолевать гемато-энцефалический барьер, L-ДОФА крысам линии НИСАГ в раннем онтогенезе, что приводило к задержке формирования гипертензивного статуса (Naumenko et al., 1989, 1990). Это подчеркивает важность центральных регуляторных звеньев как в определении уровня стресс-реактивности, так и в создании предпосылок для развития заболевания.

Так как центральную роль в регуляции стресса и в патогенезе артериальной гипертонии играет тесно связанная с нервной эндокринная система, дальнейшие усилия были направлены на выяснение особенностей функционирования ключевых звеньев – симпато-адреналовой, гипоталамо-гипофизарно-адреналовой и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем (Маслова и др., 1996; Maslova et al., 1998). Благодаря тесной кооперации с немецкими коллегами стало ясно, что гипертония у крыс линии НИСАГ относится к разряду низкорениновых (Amstislavsky et al., 2005), т.е. биосинтез основного ключевого фермента ренин-ангиотензиновой системы понижен, тем не менее конечный продукт функционирования этой системы – гормон альдостерон – выполняет, по-видимому, crucialную функцию в переходе стресс-индуцируемой гипертонии в фазу стойкого увеличения базального АД. И это важное событие в становлении стойкой гипертонии связано со стрессовой реакцией.

Как же характеризуется непосредственно стрессовая реакция у крыс НИСАГ? Стресс, как известно, реализуется по двум основным нейро-эндокринным механизмам: симпатoadреналовому и гипофизарно-адренортикаральному. И для того, и для другого у крыс НИСАГ показано наличие повышенной реактивности в ответ на действие эмоциогенных стимулов. Содержание адреналина в надпочечниках интактных крыс НИСАГ повышено, и значительно увеличена концентрация адреналина и норадреналина в плазме крови при действии такого эмоционального стресса, как хэндлинг (Markel et al., 2007; Антонов и др., 2010, 2011). Точно так же отмечено повышение стресс-реактивности основных гормонов гипофизарно-адренортикаральной системы: повышены экспрессия мРНК кортикотропин рилизинг гормона (CRH) в гипоталамусе, экспрессия мРНК проопиомеланокортина в гипофизе, секреция адренортикаротропного гормона (АКТГ) гипофизом и кортикостерона корой надпочечника при разных видах стресса, в том числе социальном (Markel et al., 2007). Неожиданным стал эффект стресса на секрецию корой надпочечника основного минералокортикоида – альдостерона (Антонов и др., 2011). Известно, что основным стимулятором секреции альдостерона является ангиотензин-II, короткий пептид, синтезируемый при активации ренин-ангиотензиновой системы, которая, как мы убедились ранее, ингибирована у крыс НИСАГ. Оказалось, что у крыс данной линии имеется повышенная чувствительность пути биосинтеза альдостерона к мобилизуемому при стрессе АКТГ. Реакция как альдостерона, так и кортикостерона на экзогенный АКТГ, вводимый крысам с дексаметазоновой блокадой эндогенного АКТГ, оказалась достоверно выше у гипертензивных крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивными крысами Вистар (Наши новые неопубликованные данные).

Усиленная реакция альдостерона при действии АКТГ и эмоционального стресса, по нашему мнению, является тем мостиком между стрессом и системой долговременной регуляции АД, который обеспечивает переход транзиторных повышений АД, характерных для острой фазы стресса, к стойкой артериальной гипертензии, так как альдостерон является основным гормоном, приводящим к задержке натрия и воды, следовательно, к увеличению массы циркулирующей крови, одному из базовых условий стойкого повышения АД. Полученные результаты, по крайней мере в случае гипертензивных крыс НИСАГ, фактически устраняют противоречие между положениями концепции А. Гайтона (Guyton, 1991) о необходимости участия почечного звена в механизме развития стойкой артериальной гипертензии и представлениями сторонников стрессового происхождения артериальной гипертензии, ярким представителем которых является Б. Фолков (Folkow, 1987). Путем вовлечения альдостерона в стрессовый ответ включается также почечное звено.

В заключение хотелось бы отметить, что в последние годы благодаря внедрению в клиническую практику метода катетеризации надпочечниковых вен с целью получения проб крови, непосредственно оттекающей от надпочечника, удается все в большем проценте случаев так называемой эссенциальной гипертензии выявить наличие скрытого альдостеронизма (Moraitis, Stratakis,

2011; Martins et al., 2014). Причем большое значение в диагностике этого состояния имеет оценка соотношения концентрации альдостерона и активности ренина в плазме крови, что позволяет говорить о другом источнике, помимо ангиотензина-II, стимуляции секреции альдостерона. Если этим источником не является опухоль коры надпочечника (синдром Конна, тогда обычно имеется асимметрия концентраций альдостерона в крови от правого и левого надпочечника), то на роль такого стимулятора прежде всего претендует АКТГ. В будущем предстоит выяснить, каковы причины повышения чувствительности пути биосинтеза альдостерона к АКТГ и, следовательно, к развитию стресс-чувствительной гипертензии. Важным фактом, установленным недавно, является повышение экспрессии генов, кодирующих ферменты конечных этапов биосинтеза кортикостерона и альдостерона – CYP11B1 и CYP11B2 – в коре надпочечника у крыс НИСАГ.

В коротком, во многом ретроспективном, обзоре, посвященном созданию оригинальной генетической модели гипертонической болезни – линии крыс НИСАГ (ISIAH), показано, что крысы этой линии являются своеобразным «живым» доказательством того, что генетически обусловленное повышение стресс-реактивности может быть причиной формирования стойкой стресс-зависимой артериальной гипертензии. С точки зрения физиологии, начало патологии находится «в голове»: причина повышенной стресс-реактивности первоначально обусловлена изменением функции нейромедиаторных систем регуляции, с которыми сопряжены основные системы реагирования как на уровне поведения, так и нейроэндокринных систем – симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-адренортикаральной. Гормональный «коктейль», с готовностью синтезируемый нейроэндокринной системой, основными компонентами которого являются адреналин, норадреналин, глюкокортикоиды и альдостерон, имеет своей мишенью не только сердце и сосуды, но и почку (альдостерон), что в совокупности и при условии генетически обусловленной склонности к повышенным реакциям при стрессе приводит к развитию стойкой артериальной гипертензии.

Благодарности

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН – VI.53.2.4.

Перевод уникальной отечественной линии крыс НИСАГ в соответствующий международным требованиям SPF-статус осуществлен при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.621.21.0010 от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Адаричев В.А., Корохов Н.П., Остапчук Я.В., Дымщиц Г.М., Маркель А.Л. Характеристика линий крыс с нормотензивным и гипертензивным статусом методом геномного фингерпринтинга. Генетика. 1996;32(12):1669-1672.

- Антонов Е.В., Маркель А.Л., Якобсон Г.С. Альдостерон и стресс зависимая артериальная гипертензия. Бюл. эксперим. биол. и медицины. 2011;152(8):148-151.
- Антонов Е.В., Морева Т.А., Черкасова О.П., Гишинский М.А., Маркель А.Л., Якобсон Г.С. Изучение секреторной активности коры надпочечника у гипертензивных крыс линии НИСАГ. Бюл. СО РАМН. 2010;30(4):68-75.
- Маркель А.Л. Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии. Изв. Ан. СССР. Сер. Биол. 1985;3:466-469.
- Маркель А.Л. Особенности поведения крыс с наследственно обусловленной артериальной гипертензией. Журн. высш. нервн. деят-сти им. И.П. Павлова. 1986;36(5):956-962.
- Маркель А.Л., Галактионов Ю.К., Ефимов В.М. Факторный анализ поведения крыс в тесте открытого поля. Журн. высш. нервн. деят-сти им. И.П. Павлова. 1988;38(5):855-863.
- Маркель А.Л., Шишкина Г.Т. Генетическая корреляция реакции артериального давления при эмоциональном стрессе с концентрацией α 1-адренорецепторов в отделах мозга. Генетика. 1992;28(11):130-133.
- Маслова Л.Н., Шишкина Г.Т., Булыгина В.В., Маркель А.Л., Науменко Е.В. Катехоламины мозга и гипоталамо-гипофизарно-адренортикальная система при наследственной артериальной гипертензии. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1996;82(4):30-37.
- Мешков И.О., Алехина Т.А., Морева Т.А., Маркель А.Л. Характеристика поведения гипертензивных крыс линии НИСАГ. Журн. высш. нервн. деят-сти им. И.П. Павлова. 2012;62(2):233-242.
- Amstislavsky S., Welker P., Fruhauf J.H., Maslova L., Ivanova L., Jensen B., Markel A.L., Bachmann S. Renal and endocrine changes in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH). *Histochem. Cell Biol.* 2005;8:1-9.
- Caspi A., Harrington H., Moffitt T.E., Milne B.J., Poulton R. Socially isolated children 20 years later: risk of cardiovascular disease. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2006;160:805-811.
- Chida Y., Steptoe A. Greater cardiovascular responses to laboratory mental stress are associated with poor subsequent cardiovascular risk status: a meta-analysis of prospective evidence. *Hypertension.* 2010;55:1026-1032.
- Cozier Y., Palmer J.R., Horton N.J., Fredman L., Wise L.A., Rosenberg L. Racial discrimination and the incidence of hypertension in US black women. *Ann. Epidemiol.* 2006;16:681-687.
- Esler M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. *J. Appl. Physiol.* 2010;108:227-237.
- Esler M.D., Krum H., Sobotta P.A., Schlaich M.P., Schmieder R.E., Bohm M. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The SymplicityHTN-2 Trial): a randomized controlled trial. *Lancet.* 2010;376:1903-1909.
- Folkow B. Psychosocial and central nervous influences in primary hypertension. *Circulation.* 1987;76(1):110-119.
- Fredrikson M., Matthews K.A. Cardiovascular responses to behavioral stress and hypertension: a meta-analytic review. *Ann. Behav. Med.* 1990;12:30-39.
- Grassi G. Assessment of sympathetic cardiovascular drive in human hypertension: achievements and perspectives. *Hypertension.* 2009;54:690-697.
- Guyton A.C. *Textbook of Medical Physiology.* Philadelphia: W.B. Saunders, 1991.
- Harrap S.B., Louis W.J., Doyle A.E. Failure of psychosocial stress to induce chronic hypertension in the rat. *J. Hypertens.* 1984;2:653-662.
- Hawkey L.C., Masi C.M., Berry J.D., Cacioppo J.T. Loneliness is a unique predictor of age-related differences in systolic blood pressure. *Psychol. Aging.* 2006;21:152-164.
- Hawkey L.C., Thisted R.A., Masi C.M., Cacioppo J.T. Loneliness predicts increased blood pressure: 5-year cross-lagged analyses in middle-aged and older adults. *Psychol. Aging.* 2010;25:132-141.
- Henry J.P., Stephens P.M., Santisteban G.A. A model of psychosocial hypertension showing reversibility and progression of cardiovascular complications. *Circ. Res.* 1975;36:156-164.
- Kahn H.A., Medalie J.H., Neufeld H.N., Riss E., Goldbourt U. The incidence of hypertension and associated factors: the Israel ischemic heart disease study. *Am. Heart J.* 1972;84:171-182.
- Kivimeaki M., Head J., Ferrie J.E., Shipley M.J., Steptoe A., Vahtera J., Marmot M.G. Hypertension is not the link between job strain and coronary heart disease in the Whitehall II study. *Am. J. Hypertens.* 2007;20:1146-1153.
- Markel A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Genetic Hypertension.* Ed. J. Sassard. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd, 1992;218:405-407.
- Markel A.L., Amstislavsky S.Ya., Naumenko E.V. The central adrenergic mechanisms of blood pressure regulation in rats with inherited arterial hypertension. *Biogenic. Amines.* 1987;4(4-6):329-338.
- Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T., Mahanova N.A., Jacobson G.S. Developmental Influences on Blood Pressure Regulation in ISIAH Rats. Eds R. McCarty, D.A. Blizard, R.L. Chevalier. *Development of the Hypertensive Phenotype: Basic and Clinical Studies.* Amsterdam, Elsevier, 1999.
- Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Yu.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. **Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension.** *J. Endocrinol.* 2007;195:439-450.
- Martins J.M., do Vale S., Martins A.F. Mild adrenal steroidogenic defects and ACTH-dependent aldosterone secretion in high blood pressure: preliminary evidence. *Intern. J. Endocrinol.* 2014; Article ID 295724, 8 pages. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/295724>
- Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Markel A.L., Naumenko E.V. Brain catecholamines and the hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system in inherited arterial hypertension. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1998;28(1):38-44.
- Moraitis A., Stratakis C. Adrenocortical Causes of Hypertension. *SAGE-Hindawi Access to Res. Int. J. Hypertens.* 2011; Article ID 624691, 10 pages. DOI: 10.4061/2011/624691
- Nalivaiko E. Frontiers in research review: stress and hypertension animal models of psychogenic cardiovascular disorders: what we can learn from them and what we cannot. *Clin. Expr. Pharmacol. Physiol.* 2011;38:115-125.
- Naumenko E.V., Maslova L.N., Gordienko N.I., Amstislavski S.Y., Dygalo N.N., Markel A.L. Persistent hypotensive effect of l-DOPA given early during development to rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Devel. Brain Res.* 1989;46:205-212.
- Naumenko E.V., Maslova L.N., Markel A.L. Correction of arterial blood pressure in adult rats with inherited stress-induced arterial hypertension by enhancement of catecholamine metabolism in early postnatal period. *Endocrinol. Experim.* 1990;24:241-248.
- Pickering T., James G., Boddie C., Harshfield G., Blank S., Laragh J. How common is white coat hypertension? *JAMA.* 1988;259(2):225-228. DOI: 10.1001/jama.259.2.225
- Roger V.L., Go A.S., Lloyd-Jones D.M., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Makuc D.M., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., Moy C.S., Mozaffarian D., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Soliman E.Z., Sorlie P.D., Sotoodehnia N., Turan T.N., Virani S.S., Wong N.D., Woo D., Turner M.B. Heart disease and stroke statistics: 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2012;125:e2-e220.
- Shankar A., McMunn A., Banks J., Steptoe A. Loneliness, social isolation, and behavioral and biological health indicators in older adults. *Health Psychol.* 2011;30:377-385.
- Sparrenberger F., Cichelerio F.T., Ascoli A.M., Fonseca F.P., Weiss G., Berwanger O., Fuchs S.C., Moreira L.B., Fuchs F.D. Does psychosocial stress cause hypertension? A systematic review of observational studies. *J. Hum. Hypertens.* 2009;23:12-19.
- Trudel X., Brisson C., Milot A. Job strain and masked hypertension. *Psychosom. Med.* 2010;72:786-793.
- Waddington C.H. Genetic assimilation. *Adv. Genet.* 1961;10:257-290.

In vivo МРТ-визуализация динамики развития глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID

Е.А. Завьялов¹, И.А. Разумов^{1,3}, Л.А. Герлинская¹, А.В. Ромашченко^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Глиобластомы являются крайне «агрессивным» типом опухолей головного мозга. Средняя продолжительность жизни пациентов с этим диагнозом составляет 9–12 мес. Для поиска эффективных подходов к терапии и диагностике этого заболевания требуется разработка адекватных экспериментальных моделей. В данной работе для описания динамики роста и морфологии клеток глиобластомы U87, ортотопически ксенотрансплантированной мышам иммунодефицитной линии SCID, мы использовали ряд методов магнитно-резонансной томографии (МРТ). Сравнение эффективности визуализации развивающейся опухоли с помощью T1- и T2-взвешенных изображений, полученных на сверхвысокопольном томографе Bruker BioSpec (11,7 T), показало, что вследствие сильной продольной намагниченности магнитного поля томографа T1-взвешенные изображения не дают необходимого контраста патологической ткани относительно здоровой в отличие от T2-взвешенных изображений. Использование T1-взвешенных изображений совместно с внутривенным введением наночастиц парамагнетика – оксида марганца (MnO) значительно усилило контраст опухоль/нормальная ткань на МРТ изображениях. Исследование динамики роста опухолевых клеток с помощью T2-взвешенных изображений показало, что развитие опухоли начинается не раньше чем через 3 недели после интракраниального введения культуры клеток U87, при этом опухолевые клетки демонстрируют экспоненциальный рост. Таким образом, были отработаны и охарактеризованы методы T1-, T2-взвешенной и MnO-усиленной МРТ на модели ортотопической ксенотрансплантации клеток глиобластомы человека U87 иммунодефицитным животным SCID, которая может быть использована в качестве *in vivo* экспериментальной модели для проверки новых противоопухолевых препаратов и схем лечения онкологических заболеваний головного мозга человека.

Ключевые слова: глиобластома U87; магнитно-резонансная томография; ксенотрансплантация; парамагнитные наночастицы оксида марганца.

In vivo MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model

E.L. Zavjalov¹, I.A. Razumov^{1,3}, L.A. Gerlinskaya¹, A.V. Romashchenko^{1,2}

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

² Design Technological Institute of Digital Technique SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and lethal type of brain cancer with the average lifespan of patients about 9–12 months. The study of tumor formation and the evaluation of new therapies for GBM require accurate and reproducible experimental brain tumor animal models. In this study we used MRI for investigation of tumor morphology and growth dynamic in orthotopic xenotransplantation immunodeficient mouse model (SCID mouse line). Comparison of T1- and T2-weighted MRI scans performed with high-field MRI scanner (Bruker, BioSpec, 11,7 T) revealed insufficient tumor/normal tissue T1-contrast because of high longitudinal magnetization of magnetic field in our scanner. Intravenous injection of paramagnetic manganese oxide (MnO) nanoparticles dramatically increased the tumor/normal tissue contrast in T1-weighted MRI scans. The study of glioblastoma growth with T2-weighted images showed that significant tumor development began no earlier than 3 weeks after cell culture intracranial injection and then the tumor grew exponentially. Thus, we developed a protocol of the characterization of glioblastoma U87 growth and morphology by T1- and T2-weighted and MnO-enhanced MRI in the orthotopic xenotransplantation mouse model. The results demonstrate that this SCID model may be used as an *in vivo* preclinical model to test the efficacy and putative side effects of novel anticancer therapies.

Key words: glioblastoma U87; MRI; xenotransplantation; paramagnetic nanoparticles.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Завьялов Е.Л., Разумов И.А., Герлинская Л.А., Ромашченко А.В. *In vivo* МРТ-визуализация динамики развития глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):460–465. DOI 10.18699/VJ15.061

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Zavjalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., Romashchenko A.V. *In vivo* MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):460–465. DOI 10.18699/VJ15.061

DOI 10.18699/VJ15.061

УДК 616-006.484.04

Поступила в редакцию 09.07.2015 г.

Принята к публикации 31.07.2015 г.

© АВТОР, 2015

✉ e-mail: zavjalov@ngs.ru

Лидирующее место в структуре нейроонкологических заболеваний занимают глиобластомы – нейроэктодермальные опухоли головного мозга человека, заболеваемость которыми с каждым годом продолжает расти. Данный тип новообразования крайне «агрессивен», что значительно усложняет процесс терапии, и средняя продолжительность жизни больных глиобластомой не превышает 9–12 мес. (Stupp et al., 2007; Lorgier et al., 2009). Высокая социальная значимость этого заболевания требует создания доступной *in vivo* модели для разработки и проверки новых терапевтических и диагностических подходов. Наиболее широко на данный момент распространены модели глиобластом, созданные на лабораторных мышах (Koutcher et al., 2002; Becher, Holland, 2006; Martinez-Murillo, Martinez, 2007; McConville et al., 2007). Существуют два основных способа создания моделей злокачественных опухолей головного мозга на мышах: ксенотрансплантация раковых клеток иммунодефицитным мышам и введение в организм генетических мутаций, индуцирующих развитие опухолей (Bachoo et al., 2002). Недостатком генетических моделей является непредсказуемость появления новообразования, что делает такой подход малоприменимым для практического использования. С другой стороны, подсадка культуры стволовых клеток человека (hTSC) в мозг мыши позволяет получить опухоль с генетическими и фенотипическими признаками глиобластомы человека при достаточно высокой эффективности трансплантации (Lee et al., 2006). Поэтому ортотопическая ксенотрансплантация клеток человека иммунодефицитным животным является наиболее распространенной моделью для *in vivo* оценки токсичности, избирательности, онколитической активности препаратов и адекватности противоопухолевой терапии. Основным препятствием для поиска эффективных способов терапии глиобластом является тот факт, что существующие модели глиомы, полученные на лабораторных мышах, неточно воспроизводят неоднородную и высоко инвазивную природу этой смертельной формы опухоли мозга (Becher, Holland, 2006; Stupp et al., 2007; Winkler et al., 2009).

В настоящее время для создания такой модели глиом человека в мире широко используются такие перевиваемые клеточные линии, как U87, U251, U373 и др., полученные из первичных клеток опухоли человека, которые трансплантируются интракраниально в мозг мышей. Локализация растущих опухолей, как правило, отслеживается с использованием количественной флюоресценции (биолюминесценции) (Szentirmai et al., 2006; Lorgier et al., 2009). Однако этот подход не учитывает морфологию опухоли в отличие от магнитно-резонансной томографии (МРТ), которая позволяет получить детальное изображение геометрии имплантированных опухолей (Koutcher et al., 2002; McConville et al., 2007). Использование МРТ для характеристики моделей глиом на мыши имеет целый ряд преимуществ по сравнению с флюоресцентным анализом (Becher, Holland, 2006). Во-первых, поскольку МРТ на данный момент является наиболее распространенным методом диагностики объемных образований, все подходы к лечению и детекции опухоли, разрабатываемые на моделях лабораторных животных, гораздо легче внедрять в медицинскую практику (Koutcher et al.,

2002). Кроме того, МРТ позволяет получать изображения немеченых клеток, тогда как оптические методы требуют стабильной экспрессии меченого флюорофором белка в опухолевых клетках, что может приводить к изменению функционирования опухолевых клеток (Dass, Choong, 2007). Наконец, МРТ является неинвазивным и точным методом, с помощью которого можно отследить динамику роста интракраниальных опухолей. Хотя в настоящее время в клинике используются надежные контрастные агенты для МРТ, до 45 % обнаруживаемых нарушений в мозге требуют гистологического подтверждения диагноза и в незначительном количестве (4 %) глиом контрастирование не приводит к усилению сигнала (Barker et al., 1997; Ginsberg et al., 1998; Sugahara et al., 1998; Castillo et al., 2001; Nelson, Cha, 2003; Atkinson et al., 2008; Stockhammer et al., 2008). Поэтому по-прежнему существует потребность в создании новых контрастных агентов, усиливающих специфичность контрастирования опухоли. Одним из возможных направлений в данной области является разработка МРТ контрастов на основе наночастиц различных парамагнетиков (Gd, Mn), которые в силу особенностей кровоснабжения злокачественных новообразований достаточно специфично ими поглощаются (Arvizo et al., 2011).

Целью данного исследования была оценка динамики развития глиобластомы человека в мозге мыши с помощью различных методов МРТ, включая сравнительный анализ контрастирования растущей глиобластомы относительно нормальной ткани при исследовании ее геометрии методами T1- и T2-взвешенных изображений МРТ и МРТ, усиленной наночастицами оксида марганца (MnO).

Материалы и методы

Животные

Исследование выполнено на 8 самцах мышей линии SCID (SHO-*PrkdcscidHrhr*) SPF-статуса в возрасте 8–12 нед. Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН однополыми семейными группами по 2–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы OptiMice (Animal Care Systems) в контролируемых условиях (при температуре 22–26 °С, относительной влажности 30–60 % и световом режиме свет/темнота 14/10 ч с рассветом в 01:00). Корм Ssniff (Германия) и деионизированную воду, обогащенную минеральной смесью «Северянка» (Санкт-Петербург), животным предоставляли *ad libitum*.

Оценка состояния мышей

В течение эксперимента состояние мышей регистрировали ежедневно. В частности, оценивали изменения состояния кожных покровов, двигательной активности и поведения. Мыши, демонстрировавшие такие патологические признаки, как изогнутость, сгорбленность, снижение активности, падение массы тела более чем на 20 %, были подвергнуты эвтаназии в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным. Мышей взвешивали до введения опухолевых клеток и затем – один раз в 5 дней вплоть до эвтаназии. Эвтаназию по завершении эксперимента осуществляли передозировкой CO₂,

сопровожаемой цервикальной дислокацией. Эвтаназия была выполнена не позднее 8 нед после введения опухолевых клеток.

Приготовление опухолевых клеток глиобластомы

За 2–3 недели до начала эксперимента культуру клеток глиомы U87, которая хранится в криобанке ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН в жидком азоте, размораживали и культивировали в течение 5–7 пассажей на среде DMEM/F12 (1:1) с 10 %-й фетальной сывороткой (FBS) фирмы «Invitrogen». Перед инъекцией клетки опухоли снимали с подложки раствором трипсин/версен и после 5 мин центрифугирования при 1000 об/мин осадок тщательно ресуспендировали в среде без сыворотки, доводя до концентрации 100 тыс. клеток в 1 мкл.

Ортотопическая ксенотрансплантация клеток U87 мышам линии SCID

Перед операцией животное помещалось в камеру с протоком воздуха 450–500 мл/мин и концентрацией изофлюрана в воздушной смеси 1,5 %. Через 3 мин животное переносили на подогреваемый операционный столик с температурой поверхности 37 °С и помещали под наркозную маску с подачей изофлюрана в концентрации 1,5 % в воздушной смеси. Суспензию клеток вводили в подкорковые структуры мозга через отверстие в черепной коробке животного. Для этого на голове в каудально-краниальном направлении делали надрез кожи длиной 3–4 мм в районе брегмы и через отверстие в черепной коробке вводили 5 мкл суспензии клеток (500 тыс. клеток на одно животное). Эксперименты были выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/ЕЕС).

Определение размеров опухолей

Динамика роста опухолей и накопление в них наночастиц марганца были исследованы с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия), 11,7 Т. Все исследования проводили на наркотизированных изофлюраном (1,5 % изофлюрана в кислородной смеси при скорости потока 250 мл/мин) животных.

Оценка размеров опухоли была проведена с помощью T2-взвешенных изображений методом TurboRARE (Rapid Imaging with Refocused Echoes). Параметры импульсной последовательности метода (TE = 33 мс, TR = 1 500 мс), параметры изображения (размер 2,5 × 2,5 см; матрица 512 × 512 пикселей, размер пикселя 0,45 × 0,45 мкм); толщина среза – 0,5 мм; расстояние между срезами – 0,5 мм; количество срезов – 15; ориентация срезов аксиальная, общее время сканирования – 3 мин.

Информация о распределении наночастиц марганца по структурам мозга мыши была получена по результатам T1-взвешенных изображений с использованием метода FLASH (Fast Low Angle SHot). Параметры импульсной последовательности метода (TE = 2,5 мс, TR = 200 мс), параметры изображения (размер 2,5 × 2,5 см; матрица 512 × 512 пикселей, размер пикселя 0,45 × 0,45 мкм), толщина среза – 0,5 мм; расстояние между срезами – 0,5 мм; количество срезов – 15; ориентация срезов аксиальная,

общее время сканирования – 6 мин. Для исследования использовали нерастворимые наночастицы оксида марганца, синтезированные методом гидролиза солей марганца (II) (Moshkin et al., 2015). Гидродинамический радиус полученных частиц, измеренный с помощью ZetaSizer (Marvel), варьировал от 30 до 60 нм. Раствор частиц в объеме 50 мкл вводили в хвостовую вену животного в соответствии со всеми установленными биоэтическими нормами. Сканирование проводили через 1 ч после введения.

Сканирование роста опухолей проводили 5 раз: через 7, 14, 21, 27, 30 дней после введения опухолевых клеток. Окончательные значения размеров опухоли высчитывали с помощью пакета программ Paravision 5.0, основываясь на разнице в контрасте между окружающими тканями и опухолью. Полученные значения размеров опухоли выражали в мкл. Контрастность опухоли оценивали как отношение МРТ сигнала в области новообразования к МРТ сигналу окружающих нервных тканей той же площади.

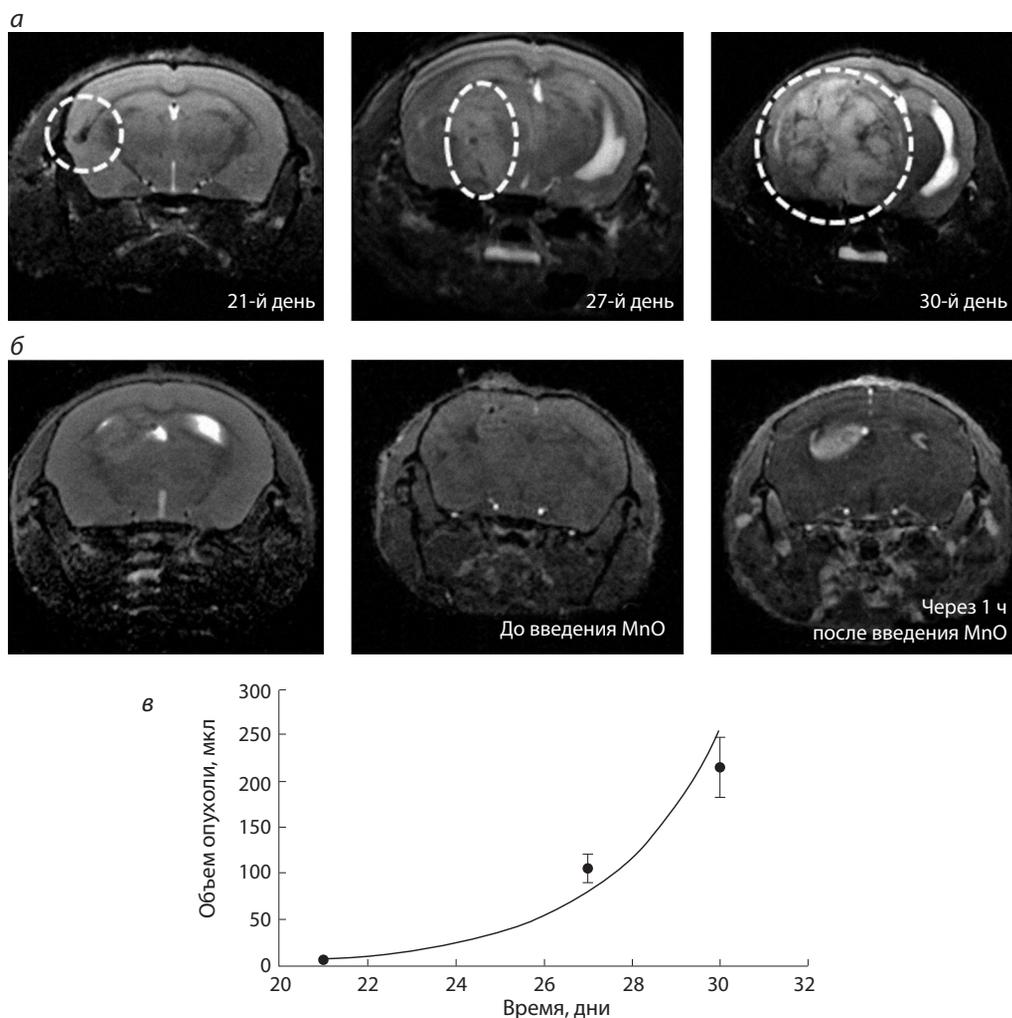
Статистический анализ

Статистический анализ разницы между опытными группами проводили с использованием непараметрических методов анализа данных.

Результаты

Визуализацию внутримозгового роста глиобластомы U87 человека у мышей линии SCID проводили с использованием T1- и T2-взвешенного МРТ. Контрастность опухоли по сравнению с окружающими тканями на T1-взвешенных изображениях была очень низкая ($1,02 \pm 0,22$; рисунок, б, посередине), тогда как на T2-взвешенных изображениях удалось четко выделить границы новообразования в точке введения клеток U87 ($1,54 \pm 0,11$; рисунок, б, слева). При этом введение наночастиц оксида марганца (MnO), который, являясь парамагнетиком, способен локально увеличивать МРТ сигнал, значительно увеличивало контрастность опухоли относительно окружающих тканей ($2,2 \pm 0,15$) на T1-взвешенных изображениях (рисунок, б, справа). Достоверного снижения T1-контраста в связи с накоплением MnO в здоровых тканях мозга не наблюдали ни через 1 ч, ни через 3 сут после введения. T2-контраст достоверно не менялся ни в опухоли, ни в окружающих тканях после введения этих частиц.

Результаты еженедельного МРТ исследования головного мозга мышей после ортотопической ксенотрансплантации клеток U87 показали, что первые признаки новообразований наблюдались через 3 недели после интракраниальной инъекции (рисунок, а, в). Дальнейший рост опухоли сопровождался экспоненциальным увеличением ее объема (рисунок, в). При оценке зависимости роста опухоли от количества введенных клеток было обнаружено, что двукратное уменьшение числа вводимых клеток приводило к задержке роста опухоли на 1 нед и к уменьшению ее объема с $104,1 \pm 41,23$ до $6,6 \pm 2,8$ мкл ($Z = 2,12, p < 0,04$). Рост опухоли сопровождался снижением массы животных до 20 % от первоначальных значений. Между размерами опухоли и изменениями массы тела отмечалась статистически значимая корреляция $r = -0,78$ ($p < 0,04$).



In vivo МРТ-визуализация динамики роста опухолей U87 и накопления в них наночастиц марганца при внутривенном введении.

а – T2-взвешенные изображения глиомы на разных стадиях развития (через 21, 27, 30 дней после введения, слева направо). Белым пунктиром обозначены границы опухоли; *б* – сравнение контрастности глиомы на T2-взвешенных (слева) и T1-взвешенных изображениях (посередине и справа) при внутривенном введении наночастиц MnO; *в* – динамика роста объема опухоли.

Обсуждение

Создание моделей глиомы человека на мышах, которые позволят изучать в динамике различные аспекты роста опухоли, является одним из важнейших этапов в поиске новых путей терапии этого заболевания (Bachoo et al., 2002; Becher et al., 2006; Lee et al., 2006; Wong et al., 2011; Frosina, 2013). Как было показано ранее, опухолевый рост сопровождается более выраженным усилением T2-контраста по сравнению с T1 (Jordan et al., 2014). В нашем исследовании мы получили схожие результаты (рисунок, *б*): по уровню T1-контраста опухоль практически не отличалась от окружающих тканей. Это обусловлено высокой продольной намагниченностью используемого в нашем приборе магнитного поля (11,7 Т), что приводит к слишком быстрой спин-решетчатой релаксации протонов (Mystkowska et al., 2013). Начальные этапы развития опухоли имеют низкие значения T2-контраста, что значительно затрудняет выявление новообразований на начальных стадиях, но последующий рост

опухоль повышает ее контрастность (Roberts et al., 2000; Abdollahi et al., 2007; Reardon et al., 2008). T2-контраст в основном определяется количеством «свободной» воды, содержащей большое количество быстро релаксирующих протонов. В организме источником быстро релаксирующих протонов, с одной стороны, является межклеточная жидкость, количество которой в ткани может возрастать в случае отека или воспаления (Rausch et al., 2003), с другой – это кровь. Поэтому при увеличении кровенаполнения ткани T2-контраст возрастает (Mintorovitch et al., 1991). Известно, что при ингибировании VEGF (vascular endothelial growth factor) у пациентов с глиобластомой динамика роста и максимальные значения T2-контраста в области опухоли достоверно снижаются по сравнению с контрольной группой (Pore et al., 2006). В связи с этим для построения адекватной модели глиальных опухолей человека и оценки эффективности противораковых препаратов необходимо разрабатывать критерии для неинвазивного исследования процессов васкуляризации

развивающейся опухоли. МРТ является в данном случае наиболее перспективной методикой, предоставляющей самые широкие диагностические возможности.

Рост опухолевых клеток *in situ* сопровождается активным ангиогенезом, при этом известно, что в области опухоли отмечается нарушение гематоэнцефалического барьера, поскольку новообразованные сосуды имеют фенестрированную стенку (Gossmann et al., 2002; Gagner et al., 2005). Диаметр «пор» новообразованных сосудов колеблется от 60 до 80 нм (Stan, 2007). Как было показано в ряде исследований, подобное свойство сосудистой стенки возможно использовать для противораковой терапии с помощью наночастиц размером, не превышающим 80 нм (Davis, Shin, 2008). В нашем исследовании для детекции точной геометрии развивающейся опухоли мы использовали наночастицы оксида марганца (MnO) с радиусом 30–60 нм. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что наночастицы MnO активно накапливаются в опухолевой ткани при их внутривенном введении, при этом в здоровых тканях мозга в исследованный нами промежуток времени достоверного увеличения концентрации частиц не наблюдалось. Эти два обстоятельства показывают, что наночастицы MnO могут быть перспективным как диагностическим, так и терапевтическим средством, которое, с одной стороны, за счет усиления контраста (рисунок, б) поможет увеличить эффективность визуализации геометрии опухоли, с другой – быть использовано для адресной доставки противоопухолевых препаратов.

Итак, в настоящей работе, во-первых, была отработана модель ортотопической ксенотрансплантации клеток глиобластомы человека U87 иммунодефицитным животным SCID, которая может быть использована в качестве *in vivo* модели для проверки новых противоопухолевых препаратов и схем лечения онкологических заболеваний головного мозга человека. Во-вторых, проведено сравнение эффективности T1- и T2-контрастов для визуализации морфологии и динамики роста глиобластом с помощью сверхвысокопольного томографа с напряженностью магнитного поля 11,7 Т. В-третьих, была показана возможность использования наночастиц оксида марганца (MnO) для увеличения эффективности визуализации геометрии развивающейся опухоли.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1.

Экспериментальное моделирование опухолей выполнено при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение с Минобрнауки России № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение с Минобрнауки России № 14.619.21.0005 о предоставлении субсидии от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)). ЯМР исследования, в том числе усиленная марганцем томография, проведены за счет Российского научного фонда (проекты №№ 14-35-00020 и 14-14-00221 соответственно) и гранта РФФИ № 15-04-01326а.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Abdollahi A., Schwager C., Kleeff J., Esposito I., Domhan S., Pechke P., Hauser K., Hahnfeldt P., Hlatky L., Debus J., Peters J.M., Friess H., Folkman J., Huber P.E. Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007;104(31):12890-12895.
- Arvizo R.R., Miranda O.R., Moyano D.F., Walden C.A., Giri K., Bhattacharya R., Mukherjee P. Modulating pharmacokinetics, tumor uptake and biodistribution by engineered nanoparticles. *PLoS One.* 2011;6(9):24374.
- Atkinson M., Juhasz C., Shah J., Guo X., Kupsy W., Fuerst D., Johnson R., Watson C. Paradoxical imaging findings in cerebral gliomas. *J. Neurol. Sci.* 2008;269(1/2):180-183.
- Bachoo R.M., Maher E.A., Ligon K.L., Sharpless N.E., Chan S.S., You M.J., Tang Y., DeFrances J., Stover E., Weissleder R., Rowitch D.H., Louis D.N., DePinho R.A. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell.* 2002;1(3):269-277.
- Barker F.G. 2nd, Chang S.M., Huhn S.L., Davis R.L., Gutin P.H., McDermott M.W., Wilson C.B., Prados M.D. Age and the risk of anaplasia in magnetic resonance-nonenhancing supratentorial cerebral tumors. *Cancer.* 1997;80(5):936-941.
- Becher O.J., Holland E.C. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res.* 2006;66(7):3355-3359.
- Castillo M., Smith J.K., Kwok L., Wilber K. Apparent diffusion coefficients in the evaluation of high-grade cerebral gliomas. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2001;22(1):60-64.
- Dass C.R., Choong P.F. GFP expression alters osteosarcoma cell biology. *DNA Cell Biol.* 2007;26(8):599-601.
- Davis M.E., Shin D.M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Rev. Drug Discovery.* 2008;7(9):771-782.
- Frosina G. Development of therapeutics for high grade gliomas using orthotopic rodent models. *Curr. Med. Chem.* 2013;20(26):3272-3299.
- Gagner J.P., Law M., Fischer I., Newcomb E.W., Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: imaging and experimental therapeutics. *Brain Pathol.* 2005;15(4):342-363.
- Ginsberg L.E., Fuller G.N., Hashmi M., Leeds N.E., Schomer D.F. The significance of lack of MR contrast enhancement of supratentorial brain tumors in adults: histopathological evaluation of a series. *Surg. Neurol.* 1998;49(4):436-440.
- Gossmann A., Helbich T.H., Kuriyama N., Ostrowitzki S., Roberts T.P., Shames D.M., van Bruggen N., Wendland M.F., Israel M.A., Brasch R.C. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a surrogate marker of tumor response to antiangiogenic therapy in a xenograft model of glioblastoma multiforme. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2002;15(3):233-240.
- Jordan J.H., D'Agostino R.B., Hamilton C.A., Vasu S., Hall M.E., Kitzman D.W., Hundley W.G. Longitudinal assessment of concurrent changes in left ventricular ejection fraction and left ventricular myocardial tissue characteristics after administration of cardiotoxic chemotherapies using T1-weighted and T2-weighted cardiovascular magnetic resonance. *circulation: Cardiovascular imaging.* 2014;7(6):872-879.
- Koutcher J.A., Hu X., Xu S., Gade T.P., Leeds N., Zhou X.J., Zagzag D., Holland E.C. MRI of mouse models for gliomas shows similarities to humans and can be used to identify mice for preclinical trials. *Neoplasia.* 2002;4(6):480-485.
- Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N.M., Pastorino S., Purow B.W., Christopher N., Zhang W., Park J.K., Fine H.A. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and

- EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*. 2006;9(5):391-403.
- Lorger M., Krueger J.S., O'Neal M., Staffin K., Felding-Habermann B. Activation of tumor cell integrin $\alpha v \beta 3$ controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009;106(26):10666-10671.
- Martinez-Murillo R., Martinez A. Standardization of an orthotopic mouse brain tumor model following transplantation of CT-2A astrocytoma cells. *Histol. Histopathol*. 2007;22(12):1309.
- McConville P., Hambardzumyan D., Moody J.B., Leopold W.R., Kreger A.R., Woolliscroft M.J., Rehemtulla A., Ross B.D., Holland E.C. Magnetic resonance imaging determination of tumor grade, early response to temozolomide in a genetically engineered mouse model of glioma. *Clin. Cancer Res*. 2007;13(10):2897-2904.
- Mintorovitch J., Moseley M.E., Chileuitt L., Shimizu H., Cohen Y., Weinstein P.R. Comparison of diffusion and T2-weighted MRI for the early detection of cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Magn. Reson. Med*. 1991;18(1):39-50.
- Moshkin M.P., Petrovski D.V., Akulov A.E., Romaschenko A.V., Gerlinskaya L.A., Muchnaya M.I., Fomin V.M. Aerosol deposition in nasal passages of burrowing and ground rodents when breathing dust-laden air. *Biol. Bul. Rev*. 2015;5(1):36-45.
- Mystkowska D., Tutas A., Jezierska-Woźniak K., Mikołajczyk A., Bobek-Billewicz B., Jurkowski M.K. High resolution small animals dedicated magnetic resonance scanners as a tool for laboratory rodents central nervous system imaging. *Pol. Ann. Med*. 2013;20(1):62-68.
- Nelson S.J., Cha S. Imaging glioblastoma multiforme. *Cancer J*. 2003;9(2):134-145.
- Pope W.B., Lai A., Nghiemphu P., Mischel P., Cloughesy T.F. MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. *Neurology*. 2006;66(8):1258-1260.
- Rausch M., Hiestand P., Baumann D., Cannel C., Rudin M. MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE. *Magn. Reson. Med*. 2003;50(2):309-314.
- Reardon D.A., Wen P.Y., Desjardins A., Batchelor T.T., Vredenburgh J.J. Glioblastoma multiforme: an emerging paradigm of anti-VEGF therapy. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2008;8(4):541-553.
- Roberts H.C., Roberts T.P., Brasch R.C., Dillon W.P. Quantitative measurement of microvascular permeability in human brain tumors achieved using dynamic contrast-enhanced MR imaging: correlation with histologic grade. *AJNR Am. J. Neuroradiol*. 2000;21(5):891-899.
- Stan R.V. Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Medicine*. 2007;11(4):621-643.
- Stockhammer F., Plotkin M., Amthauer H., van Landeghem F.K., Woiciechowsky C. Correlation of F-18-fluoro-ethyl-tyrosin uptake with vascular and cell density in non-contrast enhancing gliomas. *J. Neurooncol*. 2008;88(2):205-210.
- Stupp R., Hegi M.E., Gilbert M.R., Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J. Clin. Oncol*. 2007;25(26):4127-4136.
- Sugahara T., Korogi Y., Kochi M., Ikushima I., Hirai T., Okuda T., Shigematsu Y., Liang L., Ge Y., Ushio Y., Takahashi M. Correlation of MR imaging-determined cerebral blood volume maps with histologic and angiographic determination of vascularity of gliomas. *AJR Am. J. Roentgenol*. 1998;171(6):1479-1486.
- Szentirmai O., Baker C.H., Lin N., Szucs S., Takahashi M., Kiryu S., Kung A.L., Mulligan R.C., Carter B.S. Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect. *Neurosurgery*. 2006;58(2):365-372.
- Winkler F., Kienast Y., Fuhrmann M., Von Baumgarten L., Burgold S., Mitteregger G., Kretschmar H., Herms J. Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia*. 2009;57(12):1306-1315.
- Wong K., Young G.S., Makale M., Hu X., Yildirim N., Cui K., Wong S.T.C., Kesari S. Characterization of a human tumor sphere glioma orthotopic model using magnetic resonance imaging. *J. Neurooncol*. 2011;104:473-481.

Морфофункциональные и биохимические показатели у золотистых хомячков при развитии холангиокарциномы, ассоциированной с описторхозом

Г.А. Максимова¹, М.Ю. Пахарукова¹, Е.В. Кашина¹, Н.А. Жукова², М.Н. Львова¹, М.В. Хвостов², Д.С. Баев², А.В. Катохин¹, Т.Г. Толстикова², В.А. Мордвинов^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск, Россия

Одной из ключевых проблем трансляционной медицины является обоснованность выбора экспериментальной модели заболеваний. Холангиокарцинома, или рак желчных протоков, занимает второе место по встречаемости среди злокачественных заболеваний печени. Существует прямая связь между раком желчных протоков и глистной инвазией печени, вызванной трематодами семейства описторхид. Недавно мы продемонстрировали, что при экспериментальном описторхозе, вызванном инвазией *Opisthorchis felineus*, на фоне диметилнитрозамина у золотистых хомячков *Mesocricetus auratus* возникает холангиокарцинома. Однако до сих пор нет описания данной экспериментальной модели с точки зрения возможности ее использования для исследования холангиокарциномы человека. Цель данной работы – изучение морфофункциональных и биохимических показателей у золотистых хомячков при формировании холангиокарциномы на фоне диметилнитрозамина и инвазии *O. felineus*. Эксперимент проводили в течение 30 нед при сочетанном действии 0,00125 % диэтилнитрозамина в питьевой воде и однократного введения 50 метациркаррий *O. felineus*. Показано, что при развитии холангиокарциномы (18 нед) увеличивается суммарное содержание базофилов, моноцитов и эозинофилов, относительное содержание гранулоцитов, содержание общего и прямого билирубина, а также уровень холестерина и АЛТ. При этом снижается относительное число лимфоцитов. Согласно результатам патоморфологического, морфометрического и биохимического анализа, выбранная модель демонстрирует показатели, близкие к обнаруженным у пациентов, страдающих холангиокарциномой на фоне хронического описторхоза. Таким образом, данная модель может быть использована для тестирования противораковых препаратов, исследования механизмов образования холангиокарциномы и поиска молекулярных маркеров для ранней диагностики рака желчных протоков.

Ключевые слова: холангиокарцинома; золотистые хомячки *Mesocricetus auratus*; описторхоз; печень

The morphofunctional and biochemical characteristics of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma in a Syrian hamster model

G.A. Maksimova¹, M.Y. Pakharukova¹, E.V. Kashina¹, N.A. Zhukova², M.N. Lvova¹, M.V. Khvostov², D.S. Baev², A.V. Katokhin¹, T.G. Tolstikova², V.A. Mordvinov^{1,3}

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

² Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

The validity of experimental models of pathologies is one of the key challenges in translational medicine. Cholangiocarcinoma, or bile duct cancer, ranks second among oncological diseases of the liver. There is a strong association between bile duct cancer and parasitic infestation of the liver caused by trematodes in the family Opisthorchiidae. We have recently demonstrated that cholangiocarcinoma can develop in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by *Opisthorchis felineus* and administered with dimethylnitrosamine. However, there is still no description of how this experimental model can possibly be used in translational research. The aim of this work was to study the morphological, functional and biochemical characteristics during cholangiocarcinoma development in Syrian hamsters infected by *O. felineus* and administered with dimethylnitrosamine. The experiment lasted 30 weeks with combined exposure to dimethylnitrosamine in drinking water at a dose of 12.5 ppm and a single injection of 50 metacercariae *O. felineus*. It was shown that the development of cholangiocarcinoma (18 weeks) increased the total number of basophils, eosinophils and monocytes, the relative number of granulocytes, the amount of total and direct bilirubin, and cholesterol and ALT levels, but reduces the relative number of lymphocytes. Based on pathological, morphometric and biochemical

analyses, our model has characteristics similar to those in patients with opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Thus, this model can be used to test anticancer drugs, to study the mechanisms of cholangiocarcinogenesis and to search for molecular markers for early diagnosis of bile duct cancer.

Key words: cholangiocarcinoma; Syrian hamsters *Mesocricetus auratus*; opisthorchiasis; liver.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Максимова Г.А., Пахарукова М.Ю., Кашина Е.В., Жукова Н.А., Львова М.Н., Хвостов М.В., Баев Д.С., Катохин А.В., Толстикова Т.Г., Мордвинов В.А. Морфофункциональные и биохимические показатели у золотистых хомячков при развитии холангиокарциномы, ассоциированной с описторхозом. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):466-473. DOI 10.18699/VJ15.062

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Maksimova G.A., Pakharukova M.Y., Kashina E.V., Zhukova N.A., Lvova M.N., Khvostov M.V., Baev D.S., Katokhin A.V., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A. The morphofunctional and biochemical characteristics of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma in a Syrian hamster model. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):466-473. DOI 10.18699/VJ15.062

Холангиокарцинома, или рак желчных протоков, занимает второе место по встречаемости среди злокачественных заболеваний печени и является агрессивным видом рака: быстро прогрессирующим и трудно поддающимся лечению. Как правило, холангиокарцинома выявляется только на поздних стадиях заболевания и большинство пациентов с этим диагнозом живет не более 5 лет. Основным способом лечения рака желчных протоков является операция по удалению опухоли.

Отмечается, что в мире увеличивается заболеваемость холангиокарциномой, однако знания об этом виде рака остаются фрагментарными (Khuntikeo et al., 2015). К причинам, ограничивающим развитие исследований по данной проблеме, следует отнести небольшое число моделей холангиокарциногенеза, доступных для исследований *in vivo*.

Известно, что существует тесная ассоциация между раком желчных протоков и глистной инвазией печени, вызванной трематодами *Clonorchis sinensis* и *Opisthorchis viverrini* (Platyhelminthes: Trematoda: Opisthorchiidae) (Flavell, Lucas, 1982; Sripa et al., 2007; Aunpromma et al., 2012). Эти гельминты вызывают чрезвычайно близкие по симптоматике заболевания – клонорхоз и описторхоз. В России широко распространен еще один возбудитель описторхоза, *O. felineus*, который также является представителем семейства Opisthorchiidae. Самый большой очаг описторхоза, вызванного *O. felineus*, расположен на территории Западной Сибири в Обь-Иртышском бассейне (Mordvinov, Furman, 2010).

Печеночные сосальщики *C. sinensis*, *O. viverrini* и *O. felineus* паразитируют в желчных протоках печени и желчном пузыре человека и рыбаобразных млекопитающих. Международное агентство по исследованию рака классифицировало *O. viverrini* и *C. sinensis* как канцерогенные факторы первой группы опасности (IARC, 2012) и как основные факторы развития холангиокарциномы в эндемичных регионах.

Недавно мы продемонстрировали, что при экспериментальном описторхозе, вызванном *O. felineus*, на фоне действия диметилнитрозамина у золотистых хомячков *Mesocricetus auratus* возникает холангиокарцинома (Максимова и др., 2015). Однако до сих пор нет описания данной экспериментальной модели с точки зрения

возможности ее использования как модели для холангиокарциногенеза у людей.

Цель данной работы – изучение морфофункциональных и биохимических показателей у золотистых хомячков при формировании холангиокарциномы на фоне действия диметилнитрозамина и инвазии *O. felineus*. Результаты этого исследования необходимы для проведения сравнительного анализа с опубликованными данными по развитию холангиокарциномы у людей и оценки перспективности выбранной экспериментальной модели холангиокарциногенеза для трансляционных исследований. Выбор и развитие адекватной экспериментальной модели открывают новые возможности для поиска молекулярных маркеров рака желчных протоков и разработки систем ранней диагностики этого заболевания.

Материалы и методы

Работа проведена на 6–8-недельных хомячках-самцах вида *Mesocricetus auratus*, полученных из SPF-вивария г. Пушкино (РФ). Животных содержали по 5 особей в клетке при стандартных условиях и свободном доступе к корму и воде. Протокол экспериментальных работ был одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 7 от 19 декабря 2011 г.).

Метацеркарии *Opisthorchis felineus* выделяли из подкожной мышечной ткани естественно зараженных язей *Leuciscus idus*, пойманных в р. Обь в черте г. Новосибирска. Ткани рыб обрабатывали раствором пепсина при 37 °С, метацеркарии промывали физиологическим раствором и подсчитывали (Sripa, Kaewkes, 2000). Хомячков заражали *per os* в дозе 50 метацеркарий на животное.

Животные, находившиеся под воздействием диметилнитрозамина (ДМН), были размещены в отдельном помещении. ДМН растворен в воде до итоговой концентрации 0,00125 %. Свежий раствор ДМН готовили каждый день, помещали в непрозрачные бутылки и давали хомячкам вместо питьевой воды *ad libitum*.

Из 155 хомячков сформировали четыре группы. Группа I – контрольные животные, группа II – животные, получавшие раствор ДМН, группа III – животные, зараженные *O. felineus*, группа IV – животные, находившиеся под сочетанным влиянием *O. felineus* и ДМН. В начале эксперимента проводили заражение животных в группах

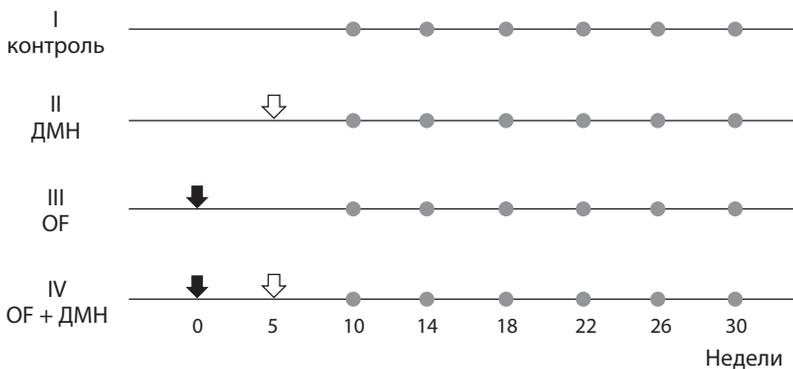


Рис. 1. Схема эксперимента.

Черная стрелка – введение *O. felineus*, белая стрелка – введение ДМН, серые точки – точки выведения животных из эксперимента.

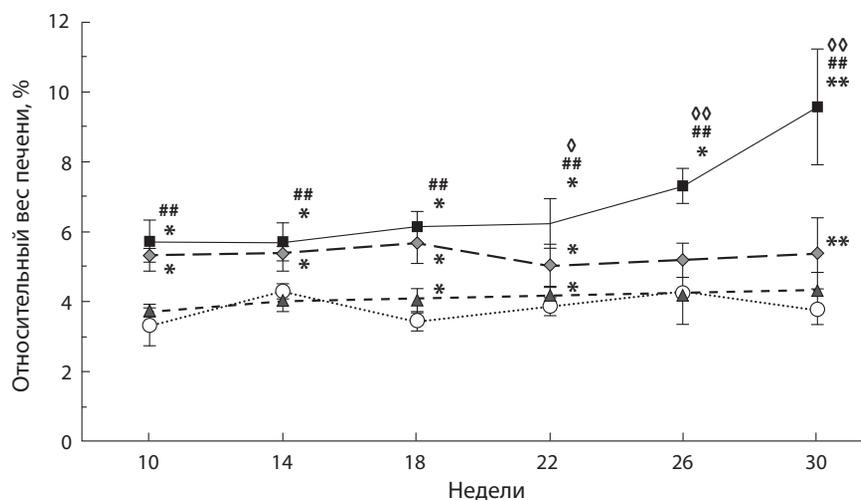


Рис. 2. Относительный вес печени (среднее ± стандартное отклонение) по группам животных: I (○) – контроль; II (▲) – ДМН; III (◇) – *O. felineus*; IV (■) – *O. felineus* + ДМН.

* – сравнение с группой I; # – сравнение с группой II; ◇ – сравнение с группой III. *, #, ◇ $p < 0,05$; **, ##, ◇◇ $p < 0,01$.

III и IV. Через месяц проверяли заражение хомячков модифицированным методом эфир-уксусной копроовоскопии (Павлюков, Березанцев, 1991). После подтверждения заражения для групп II и IV питьевую воду заменяли раствором ДМН. Животных выводили из эксперимента через 10, 14, 18, 22, 26, 30 недель от его начала (рис. 1) по 4–5 особей из контрольной группы и по 6 особей из каждой из остальных трех групп.

При каждом заборе биоматериала взвешивали животное и его печень. Вес селезенки определяли только через 26 и 30 недель. Кровь на общий анализ забирали из орбитального синуса для измерения 18 параметров периферической крови. Для проведения анализа 20 мкл цельной крови каждого животного разводили в 1,6 мл разбавителя («Изотонический разбавитель» Реамед, Россия). Полученные образцы анализировали на автоматическом гематологическом анализаторе URIT-2900 (Guilin Botest Medical Electronic Co., Ltd., Китай). Для биохимического анализа использовали сыворотку крови. Пробы обрабатывали согласно протоколам, представленным производителями: общий и прямой билирубин (Вектор Бест, Россия); холестерин общий, глюкоза, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ) (Ольвекс Диагностикум, Россия); общий белок, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (Bioscop, Германия). Измерения проводили на спектрофотометре Stat Fax 3 300 (Awareness Technology, США).

Для исследований патологических изменений печень фиксировали в забуференном 10 %-м формалине (Biovitrum, Россия). После фиксации в течение 16–18 ч при 4 °C образцы обезвоживали в серии возрастающего градиента этилового спирта и ксилола (Союзхимпром, Россия), затем изготавливали парафиновые блоки (Biovitrum, Россия) с использованием гистологического комплекса Microm (Microm, Великобритания). Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). Готовые препараты исследовали под световым микроскопом Axioskop 2 Plus (Zeiss, Германия).

Данные по весу животного, относительному весу печени и селезенки, общему и биохимическому анализу крови подвергали статистическому анализу с использованием программы Statistica 6.0 (Statsoft, США), визуализировали с помощью Microsoft Office Excel 2007 и Microsoft Office PowerPoint 2007 (Microsoft, США). Достоверность различий между экспериментальными группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни ($p < 0,05$) с использованием программы Statistica 6.0 (Statsoft, США).

Результаты

Начиная с 10-й нед эксперимента относительный вес печени хомячков, зараженных описторхами (группы III и IV), был почти в 2 раза выше, чем у контрольных животных (рис. 2). Эти различия сохранялись на протяжении практически всего срока эксперимента. Самые высокие значения относительного веса печени наблюдали в группе IV, находящейся под сочетанным влиянием *O. felineus* и диметилнитрозамина (ДМН). У животных этой группы с 22-й нед и до конца эксперимента относительный вес печени был достоверно выше, чем у животных всех остальных групп (рис. 2), и на 30-й нед был примерно в 3 раза выше, чем у контрольных животных.

На 26-й и 30-й неделях эксперимента было обнаружено достоверное увеличение относительного веса селезенки у животных групп II, III и IV по сравнению с контрольными животными. Достоверное увеличение селезенки также выявлялось при сравнении группы IV с группами II и III (таблица).

Относительный вес селезенки

Недели	I группа, %	II группа, %	III группа, %	IV группа, %
26	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01*	0,11 ± 0,02*	0,16 ± 0,02*##∅
30	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01*	0,11 ± 0,02*	0,31 ± 0,19**##∅∅

Данные представлены в виде (среднее ± стандартное отклонение). * – сравнение с группой I; # – сравнение с группой II; ∅ – сравнение с группой III. *, #, ∅ $p < 0,05$; **, ##, ∅∅ $p < 0,01$.

При макроскопическом исследовании печени животных между группами были обнаружены выраженные различия по цвету ткани, желчи и состоянию желчных протоков. Важным показателем было состояние поверхности ткани печени и ее краев. У контрольных животных, а также животных, находившихся под действием ДМН, поверхность печени оставалась упругой, гладкой и блестящей; края органа были ровными, а внепеченочные желчные протоки и желчный пузырь – прозрачными, их стенки не были утолщены (рис. 3, а, б). В отличие от этих групп у животных с описторхозом, вне зависимости от добавления ДМН, желчные протоки были значительно утолщены и с первых недель эксперимента теряли прозрачность. Начиная с 18-й нед поверхность печени становилась мелкобугристой, края органа – неровными, желчь была темного цвета (рис. 3, в). В группе с сочетанным действием гельминтов и ДМН начиная с 26-й нед наблюдали плотные бугристые бело-желтые образования с неровными контурами (рис. 3, г), число и размер этих образований к 30-й нед существенно увеличивались. Следует отметить, что у двух из шести животных под действием ДМН также были обнаружены бело-желтые образования на поверхности ткани печени, однако только на 30-й неделе.

При гистологическом исследовании в отличие от контрольных животных в печени животных, зараженных описторхами, вне зависимости от добавления ДМН с 10-й нед эксперимента обнаружен высокий уровень пролиферации клеток эпителия желчных протоков и овальных клеток. Стенки желчных протоков у инфицированных животных были сильно утолщены за счет перидуктального фиброза. В просветах желчных протоков инфицированных животных

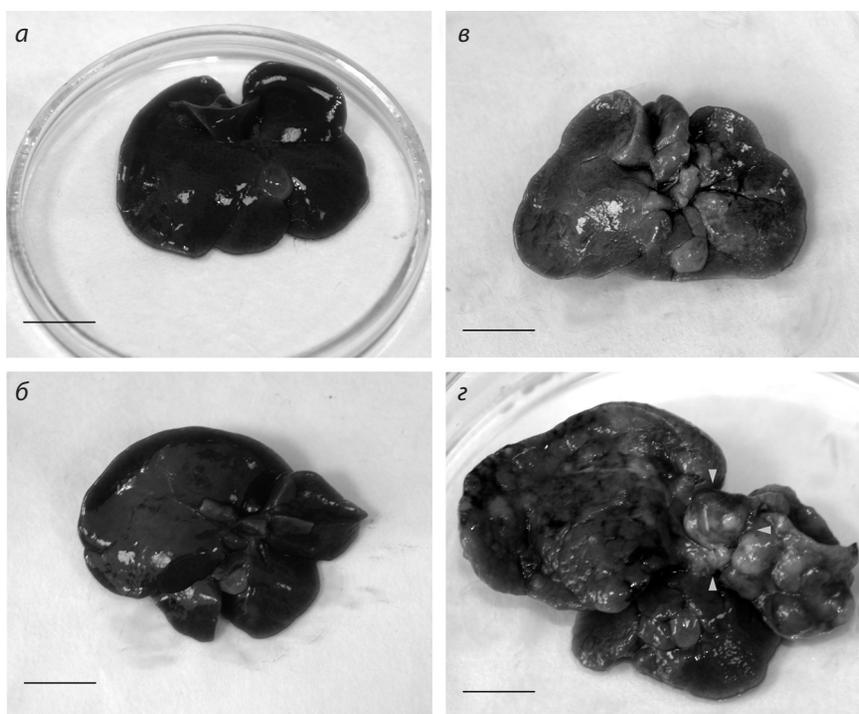


Рис. 3. Макропрепараты печени на 30-й неделе эксперимента.

а – группа I (контроль); б – группа II (ДМН); в – группа III (*O. felineus*); г – группа IV (*O. felineus* + ДМН). Масштабная линейка 1 см.

были выявлены полипозные разрастания различной величины, состоящие из фибробластов, окруженных прослойками соединительнотканых волокон, инфильтрированные яйцами паразита и темным пигментом.

В группе, находящейся под сочетанным влиянием гельминтов и ДМН, гиперпластические эффекты были более выражены, чем в других группах. У животных на 18-й нед мы наблюдали дисплазию гепатоцитов, был обнаружен холангиофиброз, образованный желчными протоками с прослойками соединительной ткани. На этом сроке эксперимента были отмечены первые признаки злокачественности патологических образований – нерегулярность в строении новообразованных желчных ходов, а также исчезновение плазматической мембраны у некоторых протоков (рис. 4, б). У двух хомячков с плотными бело-желтыми образованиями в печени на 26-й нед была найдена дифференцированная холангиоцеллюлярная карцинома. Опухоль демонстрировала инфильтративный рост (рис. 4, г). У всех животных группы IV к 30-й нед были найдены холангиоцеллюлярные опухоли (рис. 4, д).

В отличие от этого у животных, получавших только ДМН, отмечены дисплазия гепатоцитов и отдельные мелкоочаговые некрозы гепатоцитов. У них на 26-й нед была зафиксирована небольшая пролиферация желчных протоков. Однако в целом у животных без гельминтной инвазии не было активной пролиферации клеток печени и признаков фиброза. Таким образом, первые

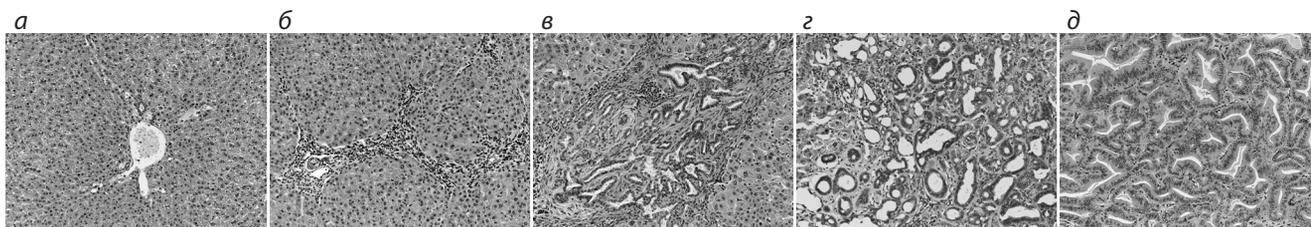


Рис. 4. Гистопатологические изменения в печени.

Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$. *a* – группа I (контроль), 30-я неделя, портальный тракт; *б* – группа IV (*O. felineus* + ДМН), 10-я неделя, пролиферация желчных протоков; *в* – группа IV (*O. felineus* + ДМН), 18-я неделя, холангиофиброз; *г* – группа IV (*O. felineus* + ДМН), 26-я неделя, фрагмент холангиокарциномы; *д* – группа IV (*O. felineus* + ДМН), 30-я неделя, фрагмент холангиокарциномы.

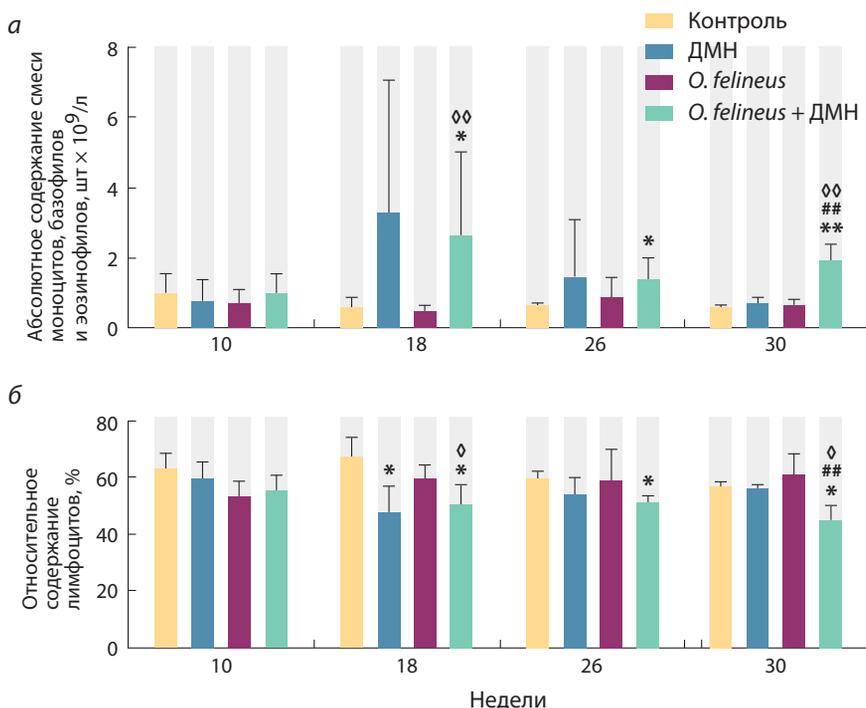


Рис. 5. Показатели общего анализа крови: абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов (*a*); относительное содержание лимфоцитов (*б*) (среднее \pm стандартное отклонение).

* – сравнение с группой I; # – сравнение с группой II; \diamond – сравнение с группой III. *, #, \diamond $p < 0,05$; **, ##, $\diamond\diamond$ $p < 0,01$.

признаки злокачественных образований эпителия желчных протоков были обнаружены в печени хомячков, находящихся под сочетанным действием ДМН и описторхоза, уже на 18-й нед эксперимента, а на 26-й нед в этой группе животных найдены холангиокарциномы.

Был проведен комплексный анализ показателей клеточного состава крови животных по 18 показателям. Большинство показателей общего анализа крови (абсолютное содержание лимфоцитов, абсолютное содержание эритроцитов, гематокрит, концентрация гемоглобина в крови, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцита, относительная ширина распределения эритроцитов по объему – стандартное отклонение и коэффициент вариации, абсолютное содержание тромбоцитов, тромбокрит, средний объем тромбоцитов) в нашем случае не изменились и достоверной разницы между группами животных не демонстрировали (данные не приведены).

Однако ряд показателей клеточного состава крови менялся в ходе эксперимента. Так, обнаружено, что с 18-й нед достоверно увеличивается суммар-

ный показатель содержания смеси базофилов, моноцитов и эозинофилов у группы животных, находящихся под сочетанным воздействием *O. felineus* и ДМН. В группе IV на 30-й нед исследования этот показатель был в три раза выше, чем у животных остальных групп (рис. 5, *a*). В группе II также наблюдали увеличение этого показателя на сроках 18 и 26 нед, однако оно было недостоверным.

Увеличение абсолютного содержания смеси базофилов, моноцитов и эозинофилов у животных экспериментальных групп хорошо согласуется с повышением относительного содержания гранулоцитов. Рост этого показателя у животных экспериментальных групп также был зарегистрирован с 18-й нед эксперимента (данные не приведены). Важным показателем, который с 18-й нед достоверно изменялся у животных, находящихся под сочетанным действием ДМН и *O. felineus*, было снижение относительного числа лимфоцитов (рис. 5, *б*).

В ходе работы был проведен также комплексный биохимический анализ крови животных по 9 показателям. В результате проведенного исследования был выявлен ряд существенных изменений в группе IV. В частности уровни прямого и общего билирубина в норме близки к нулю, что и было зафиксировано практически на всех сроках эксперимента в группе контроля и группах, находящихся под воздействием только гельминтов или только ДМН (рис. 6, *a, б*). В отличие от этого в группе, находящейся под сочетанным влиянием *O. felineus* и ДМН, уровень общего билирубина начинает увеличиваться с 18-й нед эксперимента. Важно отметить, что начало роста этого показателя совпа-

дает с появлением первых признаков злокачественности патологических образований, обнаруженных при гистологическом исследовании. У животных на 26-й нед величина общего билирубина составляет около 60 мкмоль/л, а к концу эксперимента – уже свыше 200 мкмоль/л. Изменение уровня прямого билирубина в значительной мере совпадает с динамикой общего билирубина (рис. 6, в). Таким образом, важным биохимическим показателем, ассоциированным с развитием холангиокарциномы, является, по-видимому, уровень билирубина.

На ранних сроках эксперимента (10–18 нед) у животных группы IV по сравнению с животными остальных групп был существенно повышен уровень холестерина (рис. 6, в). Кроме того, в группе IV в отличие от других групп с 14-й нед и до конца эксперимента был повышен общий белок крови. У животных этой группы по отношению к контрольным животным был отмечен также пониженный уровень глюкозы (данные не приведены).

Во всех экспериментальных группах относительно контроля был зарегистрирован повышенный уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ). Отметим, что у животных группы IV на ранних сроках эксперимента (10-я нед) показатель АЛТ был наибольшим (рис. 6, г). Достоверных различий в уровнях других ферментов печени (аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза и лактатдегидрогеназа) между всеми группами не выявлено.

На основании полученных данных можно заключить, что при развитии холангиокарциномы (группа IV) увеличивается суммарный показатель содержания базофилов, моноцитов и эозинофилов, повышается относительное содержание гранулоцитов, однако относительное число лимфоцитов снижается. При формировании холангиокарциномы происходит также повышение содержания общего и прямого билирубина, а также уровня холестерина и АЛТ. Изменение наибольших численных показателей начинается с 18-й нед эксперимента, что совпадает со временем появления первых признаков злокачественности патологических образований печени.

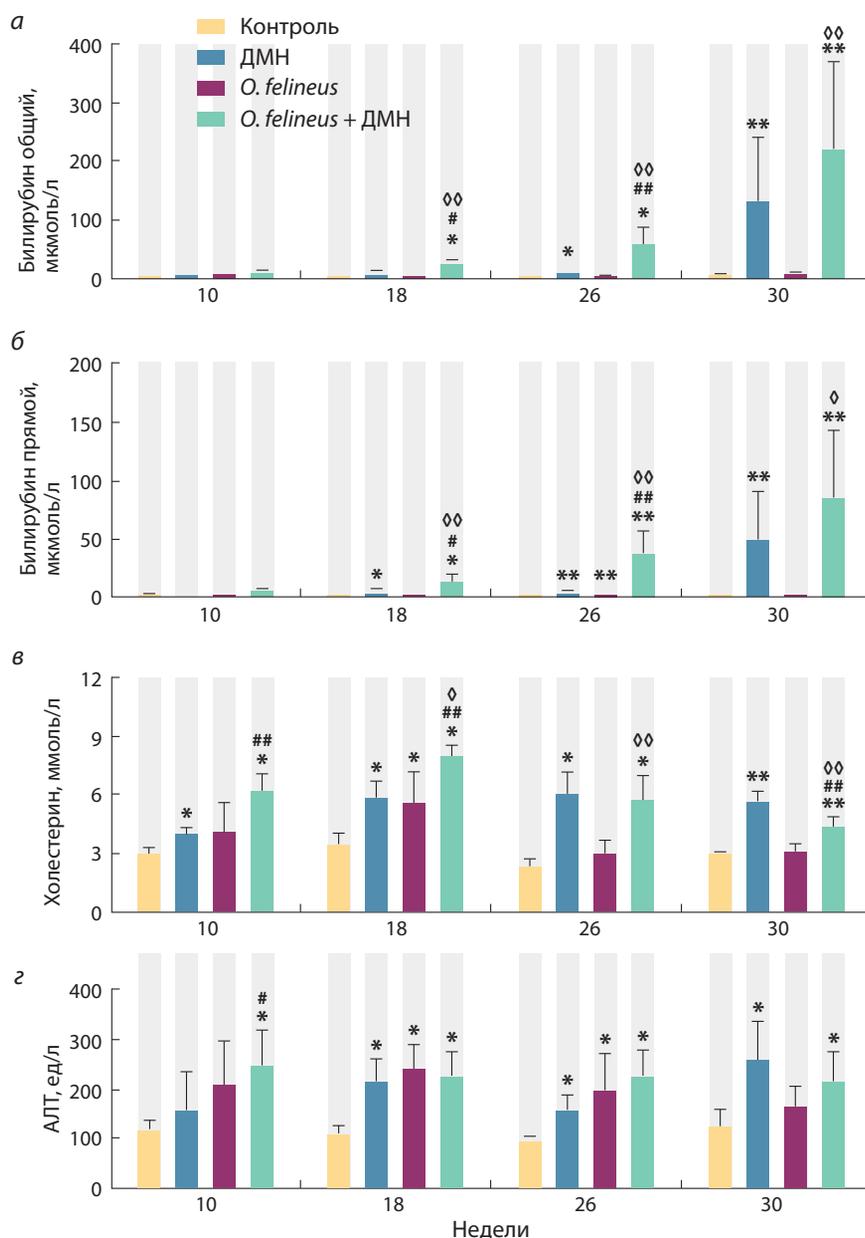


Рис. 6. Биохимические показатели крови: билирубин общий (а); билирубин прямой (б); холестерин (в); АЛТ (г) (среднее ± стандартное отклонение).

* – сравнение с группой I; # – сравнение с группой II; ◊ – сравнение с группой III. *, #, ◊ $p < 0,05$; **, ##, ◊◊ $p < 0,01$.

Однако еще до появления этих признаков у животных группы IV были зарегистрированы повышенные уровни холестерина и АЛТ.

Обсуждение

Возникновение рака желчных протоков у золотистых хомячков при сочетанном воздействии *O. felineus* и ДМН хорошо объясняется классической трехстадийной теорией канцерогенеза. Согласно этой теории, злокачественные опухоли развиваются при синергическом воздействии двух агентов. Один из них является инициатором опухолеиндуцирующего события, а второй способствует пролиферации инициированных клеток, т. е. обладает свойствами промотора опухолей.

В модели холангиокарциномы с использованием золотистых хомячков инициатор возникновения злокачественных клеток – ДМН, соединение,

обладающее генотоксическим действием. Известно, что ДМН содержится в большом количестве в окружающей среде, в пище и сигаретном дыме. Таким образом, человек каждый день сталкивается с этим соединением и выбор ДМН в качестве инициатора опухолеиндуцирующего события вполне оправдан.

Однако для опухолевого роста необходимы определенные условия, способствующие митозу инициированных клеток. Такие условия, судя по всему, возникают при описторхозе. Действительно, печень больных описторхозом значительно увеличивается в размерах, клетки протоков активно пролиферируют и иногда формируют кисты. Очень близкая картина патологических изменений печени регистрируется и при экспериментальном описторхозе с использованием золотистых хомячков.

Кроме того, показано, что отдельные белки описторхов могут оказывать митогенный и антиапоптотический эффект на клетки хозяина, действуя как классический митоген (Smout et al., 2009, Srira et al., 2012). В нашем исследовании также были выявлены пролиферация желчных протоков, гиперплазия и метаплазия эпителия желчных протоков, холангиофиброз и полипы. Таким образом, гельминты *O. felinus* способны стимулировать пролиферацию клеток и тем самым индуцировать предраковые изменения (Lvova et al., 2012). Найденные изменения в печени, появившиеся под влиянием *O. felinus* и при сочетанном воздействии гельминтов и ДМН, схожи с патологическими изменениями, описанными при инвазии других печеночных сосальщиков – *O. viverrini* и *C. sinensis* (Thamavit et al., 1978; Lee et al., 1993; Songserm et al., 2009).

В нашей работе была выявлена ассоциация между увеличением веса селезенки и развитием холангиокарциномы. В литературе нет единства по этому вопросу. Так, есть сведения, что при холангиокарциноме на фоне описторхоза спленомегалия встречается, но довольно редко (Шайн, 1974). По данным других авторов, при развитии гнойных осложнений у пациентов с длительной инвазией *O. felinus* спленомегалия встречается часто (Бражникова, 1997). Интересно, что при инвазии *O. viverrini* вес селезенки не изменяется ни у хомячков (Flavell, Flavell, 1986), ни у людей (Upatham et al., 1982). Однако под влиянием *C. sinensis* у людей селезенка увеличивается (Rohela et al., 2006), но увеличение происходит не у всех пациентов, страдающих клонорхозом (Wang et al., 2004).

По нашим данным, показатели общего и биохимического анализа крови по экспериментальным подгруппам были преимущественно стабильны. Постоянство этих параметров крови описано также при хроническом описторхозе у людей (Поддубная 2009; Щёголева и др., 2009; Поддубная, Щёголева, 2011).

В то же время существуют данные, что у пациентов с хроническим описторхозом при таких осложнениях, как абсцесс и холангиокарцинома, изменялись клеточные и биохимические показатели крови (Бражникова, Толкаева, 2000; Бражникова, Толкаева, 2002; Цхай и др., 2011). По нашим данным, в группе хомячков, подверженных сочетанному влиянию *O. felinus* и ДМН, отмечается повышение показателей гранулоцитов, а также смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов. Это может свидетельствовать о воспалительном процессе, что согласуется

с данными при воспалительных процессах, сопровождающих абсцессы и холангиокарциному у людей (Альперович и др., 2010; Цхай и др., 2011).

Отмеченное в данной работе снижение числа лимфоцитов в крови хомячков группы IV также согласуется с данными, полученными при холангиоцеллюлярном раке печени у людей (Бражникова, Толкаева, 2002; Альперович и др., 2010). То же самое можно сказать о повышении уровня билирубина, АЛТ и холестерина у животных группы IV. Рост этих показателей зарегистрирован у пациентов с хроническим описторхозом (Бакштановская и др., 2002; Бакштановская, Степанова, 2005). При этом аспаратаминогидрогеназа (АСТ) и лактатдегидрогеназа зачастую остаются в норме (Бакштановская и др., 2002; Бакштановская, Степанова, 2005;) или у некоторых пациентов бывает повышен лишь уровень АСТ (Поддубная, 2009; Soukhathammavong et al., 2015). При выполнении данной работы нами получены аналогичные данные.

При хроническом описторхозе и холангиокарциноме у людей зачастую повышен уровень щелочной фосфатазы (ЩФ) (Бражникова, Толкаева, 2000; Бакштановская и др., 2002; Бакштановская, Степанова, 2005). Мы не обнаружили существенных изменений этого показателя у животных экспериментальных групп. Есть сведения, что у людей при инвазии *O. viverrini* уровень ЩФ тоже может не подниматься (Soukhathammavong et al., 2015).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что согласно результатам патоморфологического, морфометрического и биохимического анализа модель холангиокарциномы на фоне действия ДМН и *O. felinus* с использованием золотистых хомячков демонстрирует показатели, близкие к обнаруженным у пациентов, страдающих холангиокарциномой на фоне хронического описторхоза.

Таким образом, данная модель может быть использована для тестирования противораковых препаратов, исследования механизмов образования холангиокарциномы и поиска молекулярных маркеров для ранней диагностики рака желчных протоков.

Благодарности

Работа выполнена при частичной поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН VI.60.1.1. (№ гос. регистрации 01201280335), гранта партнерских исследований СО РАН (№ 19), при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ №15-04-03551а.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Альперович Б.И., Бражникова Н.А., Цхай В.Ф., Мерзликин Н.В., Толкаева М.В., Клиновицкий И.Ю. Хирургические аспекты осложненного и сопутствующего хронического описторхоза. СГМУ. Томск, 2010.

- Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф. Анализ комплекса биохимических показателей функций печени при хроническом описторхозе. *Мед. паразитол. паразит. бол.* 2005;(4):18-21.
- Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф., Шонин А.Л., Терехина В.К., Пономарева О.В. Биохимическая характеристика функций печени при различных клинических формах хронического описторхоза. *Мед. паразитол. паразит. бол.* 2002;(1):12-15.
- Бражникова Н.А. Хирургические осложнения хронического описторхоза. *Анн. хирург. гепат.* 1997;(2):88-93.
- Бражникова Н.А., Толкаева М.В. Особенности клиники, диагностики и лечения описторхозных абсцессов печени. *Анн. хирург. гепат.* 2000;5(1):37-42.
- Бражникова Н.А., Толкаева М.В. Рак печени, желчных путей и поджелудочной железы при хроническом описторхозе. *Бюл. сиб. мед.* 2002;(2):71-77.
- Максимова Г.А., Жукова Н.А., Кашина Е.В., Львова М.Н., Катокхин А.В., Толстикова Т.Г., Мордвинов В.А. Роль *Opisthorchis felineus* в индукции рака желчных протоков. *Паразитология.* 2015;49:3-11.
- Павлюков И.А., Березанцев Ю.А. Эфир-уксусный метод исследования фекалий на яйца описторхисов. *Мед. паразитол. паразит. бол.* 1991;3:57.
- Поддубная О.А. КВЧ-терапия фоновым резонансным излучением в хронореабилитации больных хроническим холециститом в сочетании с хроническим описторхозом. *Бюл. сиб. мед.* 2009;4(2):183-188.
- Поддубная О.А., Щёголева С.Ф. Комплексное немедикаментозное лечение больных с дисфункцией желчного пузыря при хроническом описторхозе. *Бюл. сиб. мед.* 2011;6:30-34.
- Цхай В.Ф., Бражникова Н.А., Мерзлякин Н.В., Максимов М.А., Саипов М.Б., Еськов И.М., Хлебникова Ю.А. Описторхозные абсцессы печени. *Бюл. сиб. мед.* 2011;3:129-135.
- Шайн А.А. Семиотика первичного рака печени. *Вопр. онкологии.* 1974;20(9):50-56.
- Щеголева С.Ф., Поддубная О.А., Белобородова Э.И., Рехтина С.Д. Магнитотерапия в комплексном лечении больных хроническим описторхозом. *Бюл. сиб. мед.* 2009;3:121-127.
- Aunpromma S., Tangkawattana P., Papirom P., Kanjampa P., Tesana S., Sripa B., Tangkawattana S. High prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection in reservoir hosts in four districts of Khon Kaen Province, an opisthorchiasis endemic area of Thailand. *Parasitol. Int.* 2012;61:60-64. DOI: 10.1016/j.parint.2011.08.004
- Flavell D.J., Flavell S.U. *Opisthorchis viverrini*: pathogenesis of infection in immunodeprived hamsters. *Parasite Immunol.* 1986;8: 455-466.
- Flavell D.J., Lucas S.B. Potentiation by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, of the carcinogenic action of N-nitrosodimethylamine upon the biliary epithelium of the hamster. *Br. J. Cancer.* 1982;46(6):985-989.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. A review of human carcinogens. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012.100(B):1-441.
- Khuntikeo N., Chamadol N., Yongvanit P., Loilome W., Namwat N., Sithithaworn P., Andrews R.H., Petney T.N., Promthet S., Thinkhamrop K., Tawarunguang C., Thinkhamrop B. CASCAP investigators. Cohort profile: cholangiocarcinoma screening and care program (CASCAP). *BMC Cancer.* 2015;15:459. DOI: 10.1186/s12885-015-1475-7
- Lee J.H., Rim H.J., Bak U.B. Effect of *Clonorchis sinensis* infection and dimethylnitrosamine administration on the induction of cholangiocarcinoma in Syrian golden hamsters. *Korean J. Parasitol.* 1993;31(1):21-30. DOI: 10.3347/kjp.1993.31.1.21
- Lee J.H., Yang H.M., Bak U.B., Rim H.J. Promoting role of *Clonorchis sinensis* infection on induction of cholangiocarcinoma during two-step carcinogenesis. *Korean J. Parasitol.* 1994;32(1):13-18. DOI: 10.3347/kjp.1994.32.1.13
- Lvova M.N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. Comparative histopathology of *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):167-172. DOI: 10.1016/j.parint.2011.08.005
- Mordvinov V.A., Furman D.P. The Digenea parasite *Opisthorchis felineus*: a target for the discovery and development of novel drugs. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2010;10(5):385-401. DOI: 10.2174/187152610793180858
- Rohela M., Johari S., Jamaiah I., Init I., Lee S.H. Acute cholecystitis caused by *Clonorchis sinensis*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2006;37(4):648-651.
- Smout M.J., Laha T., Mulvenna J., Sripa B., Suttiprapa S., Jones A., Brindley P.J., Loukas A.A. A granulins-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000611. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000611
- Songserm N., Prasongwattana J., Sithithaworn P., Sripa B., Pipitkool V. Cholangiocarcinoma in experimental hamsters with long-standing *Opisthorchis viverrini* infection. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2009;10(2):299-302.
- Soukhathammavong P.A., Rajpho V., Phongluxa K., Vonghachack Y., Hattendorf J., Hongvanthong B., Rasaphon O., Sripa B., Akkha-vong K., Hatz C., Odermatt P. Subtle to severe hepatobiliary morbidity associated with *Opisthorchis viverrini* infection in Southern Laos. *Acta Trop.* 2015;141(B):303-309. DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.09.014
- Sripa B., Brindley P.J., Mulvenna J., Laha T., Smout M.J., Mairiang E., Bethony J.M., Loukas A. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* multiple pathways to cancer. *Trends Parasitol.* 2012;28(10):395-407. DOI: 10.1016/j.pt.2012.07.006
- Sripa B., Kaewkes S. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. *Int. J. Parasitol.* 2000;30(6):735-740. DOI:10.1016/S0020-7519(00)00054-0
- Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Mairiang E., Laha T., Smout M., Paironkul C., Bhudhisawasdi V., Tesana S., Thinkamrop B., Bethony J.M., Loukas A., Brindley P.J. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med.* 2007;4(7):e201. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040201
- Thamavit W., Bhamarapravati N., Sahaphong S., Vajrasthira S., Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res.* 1978;38(12):4634-4639.
- Upatham E.S., Viyanant V., Kurathong S., Brockelman W.Y., Menaruchi A., Saowakontha S., Intarakhao C., Vajrasthira S., Warren K.S. Morbidity in relation to intensity of infection in *Opisthorchiasis viverrini*: study of a community in Khon Kaen, Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982;31(6):1156-1163.
- Wang K.X., Zhang R.B., Cui Y.B., Tian Y., Cai R., Li C.P. Clinical and epidemiological features of patients with clonorchiasis. *World J. Gastroenterol.* 2004;10(3):446-448.

Корреляция чувствительности к гепатоканцерогенезу, индуцированному введением орто-аминоазотолуола, со степенью активации сигнальных путей Ahr и Car у мышей

Н.В. Багинская¹, Е.В. Кашина¹, М.Ю. Шаманина¹, С.И. Ильницкая¹, В.И. Каледин¹, В.А. Мордвинов^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск, Россия

Орто-аминоазотолуол (ОАТ) является сильным гепатоканцерогеном для большинства линий мышей. Ранее было показано, что введение ОАТ активирует в печени этих животных арил-гидрокарбонный рецептор (Ahr) и конститутивный рецептор андростанов (Car). Оба эти рецептора принимают непосредственное участие в процессе гепатоканцерогенеза. В данной работе были исследованы влияние хронического введения ОАТ на уровни экспрессии мРНК Ahr, Car и их генов-мишеней Cyp1a1 и Cyp2b10, а также корреляция их экспрессии со степенью воспалительной реакции у линий мышей DD/He (DD) и CC57BR/Mv (BR), контрастных по чувствительности к гепатоканцерогенезу. Самцам мышей обеих линий в течение 2 мес. четырехкратно вводили масляный раствор ОАТ в дозе 225 мг/кг веса тела. Контрольные животные получали эквивалентное количество растворителя. Мышей забивали через 1 и 4 сут после последнего введения ОАТ. Экспрессию генов в печени определяли методом ПЦР в реальном времени. Степень воспалительной реакции оценивали в те же сроки по концентрации фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) в сыворотке крови. У резистентных мышей BR введение ОАТ индуцировало более выраженное и длительное повышение уровня экспрессии мРНК Cyp1a1, свидетельствующее о преимущественной активации Ahr у этих животных. В то же время у мышей чувствительной линии DD наблюдалось более выраженное повышение уровня экспрессии Cyp2b10, что указывает на преимущественную активацию Car. Также у мышей линии DD, в отличие от BR, наблюдалась сильная и длительная воспалительная реакция в ответ на введение ОАТ. Полученные результаты дают основания полагать, что преобладание активации сигнального пути Ahr над активацией сигнального пути Car может быть фактором резистентности к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу.

Ключевые слова: мыши; межлинейные различия; о-аминоазотолуол; Ahr; Car; ПЦР-РВ.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Багинская Н.В., Кашина Е.В., Шаманина М.Ю., Ильницкая С.И., Каледин В.И., Мордвинов В.А. Корреляция чувствительности к гепатоканцерогенезу, индуцированному введением орто-аминоазотолуола, со степенью активации сигнальных путей Ahr и Car у мышей. Вавилонский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):474-479. DOI 10.18699/VJ15.063

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Baginskaya N.V., Kashina E.V., Shamanina M.Yu., Ilnitskaya S.I., Kaledin V.I., Mordvinov V.A. Correlation of susceptibility to ortho-aminoazotoluene-induced hepatocarcinogenesis with Car and Ahr signaling pathway activation in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):474-479. DOI 10.18699/VJ15.063

DOI 10.18699/VJ15.063

УДК 57.021:616-006

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

Принята к публикации 10.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

e-mail: bagin@bionet.nsc.ru; mordvin@bionet.nsc.ru

Correlation of susceptibility to ortho-aminoazotoluene-induced hepatocarcinogenesis with Car and Ahr signaling pathway activation in mice

N.V. Baginskaya¹, E.V. Kashina¹, M.Yu. Shamanina¹, S.I. Ilnitskaya¹, V.I. Kaledin¹, V.A. Mordvinov^{1, 2}

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

² Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

Ortho-aminoazotoluene (OAT) is a potent hepatocarcinogen for most strains of mice. It has previously been shown that OAT application activates the aryl hydrocarbon receptor (Ahr) and the constitutive androstane receptor (Car) in the mouse liver. Both of these receptors are directly involved in the process of hepatocarcinogenesis. In this study, we investigated the effect of chronic OAT administration on the mRNA expression levels of Ahr, Car and their target genes Cyp1a1 and Cyp2b10 in the liver of DD/He (DD) and CC57BR/Mv (BR) mouse strains contrasting in sensitivity to hepatocarcinogenesis. The inflammatory response of these strains was also studied. Male mice of both strains received OAT oil solution at the dose of 225 mg/kg body weight four times within two months. Control animals received the equivalent solvent amount. Mice were sacrificed on days 1 and 4 after the last OAT administration. Gene expression levels in the liver were determined by real-time PCR. The inflammatory response was evaluated by serum concentration of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). In resistant BR mice, OAT induced a pronounced and prolonged increase in Cyp1a1 mRNA, showing primarily Ahr activation, while the DD strain displayed a more pronounced elevation of Cyp2b10 expression, indicative of Car activation. In addition, a strong inflammatory response to OAT was recorded in DD mice but not in BR. It is assumed that the prevalence of Ahr signaling pathway activation over Car signaling pathway activation is a factor of resistance to OAT-induced hepatocarcinogenesis.

Key words: mice; interlinear difference; o-aminoazotoluene; Ahr; Car; real-time PCR.

Гепатокарцинома – одна из наиболее часто встречающихся опухолей человека. Ее развитие зависит как от внешних условий (уровень загрязнения окружающей среды, стресс и др.), так и от генетических факторов (Chen, Chen, 2002; Feo et al., 2006). Инбредные линии мышей, различающиеся по чувствительности к гепатоканцерогенезу, являются хорошим объектом для изучения молекулярных механизмов и роли генетических факторов в гепатоканцерогенезе. В последнее время широко обсуждается ключевая роль в развитии опухолей печени транскрипционных факторов (ТФ), активируемых ксенобиотиками. Эти факторы, получившие название ксеносенсоров ввиду их непосредственного участия в процессах регуляции метаболизма ксено- и эндобиотиков, также могут влиять на гормональный статус, воспаление, апоптоз и пролиферацию как нормальных, так и опухолевых клеток (Kolaya et al., 1995; Xie et al., 2003; Marlowe, Puga, 2005). Активация ксеносенсоров, таких как конститутивный рецептор андростанов (Car, Nr1i3) и арил-гидрокарбонный рецептор (Ahr), стимулирует развитие опухолей печени у мышей и крыс (Moennikes et al., 2004; Yamamoto et al., 2004; Huang et al., 2005). В то же время в определенных условиях Ahr может играть роль опухолевого супрессора, благодаря его способности стимулировать апоптоз, подавлять пролиферацию клеток и воспаление (Mitchell et al., 2006; Fan et al., 2010; Hanieh, 2014). Известно, что хроническое воспаление является фактором гепатоканцерогенеза (Nakagawa, Maeda, 2012), причем его эффекты в значительной степени опосредуются через индукцию провоспалительных цитокинов, в частности ФНО α (Liedtke, Trautwein, 2012). Активация Ahr подавляет экспрессию ФНО α и других провоспалительных цитокинов, снижая тем самым степень воспаления (Hanieh, 2014). Ahr также может регулировать активность Car, повышая уровень его мРНК в печени мышей (Patel et al., 2007). Поэтому в экспериментальных моделях для лучшего понимания молекулярных механизмов канцерогенеза необходимо исследовать совместную деятельность этих рецепторов.

О-аминоазотолуол (ОАТ) является сильным гепатоканцерогеном для мышей, однако механизм его канцерогенного действия недостаточно ясен. Показано, что мыши инбредных линий A/Sn, A/He, SWR и DD/He высокочувствительны к его гепатоканцерогенному действию, в то время как мыши линий CC57BR/Mv и AKR резистентны (Каледин и др., 1990). Также установлено, что в печени мышей ОАТ активирует как Ahr (Cheung et al., 1994; Zacharova et al., 2003), так и Car (Smetanina et al., 2011). Активация Ahr индуцирует каскад ферментов метаболизма ароматических соединений и азобензолов, включая ОАТ. Таким образом, ОАТ индуцирует ферменты своего собственного метаболизма (Cheung et al., 1994; Mikhailova et al., 2005). В результате этого процесса происходит активация ОАТ, ведущая к образованию ДНК-аддуктов и, как следствие, к появлению мутаций и канцерогенезу (Miller, Miller, 1981). С другой стороны, тот же процесс может привести к ускоренному выведению ОАТ из организма, снижая его канцерогенный эффект. Такая возможность подтверждается, в частности, исследованиями Nebert с соавт. (2004), показавшими, что *in vivo* цитохромы Cyp1a1/2

у мышей выполняют преимущественно детоксифицирующую функцию. Показано, что ОАТ-индуцированный гепатоканцерогенез часто происходит на фоне хронического воспаления (Багинская и др., 2007), интенсивность которого зависит от активности ряда транскрипционных факторов, Car, Ahr, Pparg и других, а воспаление, в свою очередь, влияет на их активность (Glass, Saijo, 2010; Gerbal-Chaloin, 2013; Hanieh, 2014). Мы предположили, что в основе различий по чувствительности к гепатоканцерогенезу и особенностей воспалительного ответа у мышей разных линий могут лежать различия в уровне функционирования транскрипционных факторов Car и Ahr.

В данной работе исследовали влияние хронического введения ОАТ на уровень экспрессии мРНК Car, Ahr и их маркерных генов Cyp1a1 и Cyp2b10 в печени, а также на уровень ФНО α в крови у линий мышей DD/He и CC57BR/Mv, контрастных по чувствительности к гепатоканцерогенезу.

Материалы и методы

В опытах использовали гепатоканцероген 2'-3-диметил-4-аминоазобензол (орто-аминоазотолуол, ОАТ) фирмы «ICN», США. Опыты были сделаны на самцах мышей инбредных линий CC57BR/Mv (BR) и DD/He (DD), полученных из вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Эксперименты проводились в соответствии с рекомендациями, приведенными в руководстве по уходу и использованию лабораторных животных национальных институтов здравоохранения (Протокол № 17.3 от 17 июня 2013 г. комиссии по биоэтике ИЦиГ СО РАН). Мышей содержали группами по 6–8 особей в клетке в естественных условиях освещения. Животные получали комбикорм ПК 120-1 («Лабораторснаб», Москва) и воду *ad libitum*.

Экспериментальным животным начиная с двухмесячного возраста четырехкратно с интервалом в 2 нед вводили ОАТ в дозе 225 мг/кг веса тела внутривентриально. Контрольные животные получали соответствующее количество растворителя – оливкового масла. Еще одну контрольную группу составляли интактные животные. Через 1 и 4 сут после окончания введения канцерогена мышам забивали для забора образцов крови и ткани печени. Сыворотку крови хранили при температуре -20°C . Ткань печени замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C для дальнейшего использования.

Концентрацию фактора некроза опухоли (ФНО α) в сыворотке крови определяли иммуноферментным способом с помощью набора реактивов Mouse TNF- α ELISA Kit («eBioscience»).

Выделение РНК и ПЦР анализ

Все стадии выделения и анализа РНК, а также получения кДНК проводили согласно протоколам фирм-производителей соответствующих наборов. РНК выделяли из 20–40 мг ткани печени с использованием набора AxyPrep™ Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences). Перед получением кДНК 1 мкг РНК подвергали ДНК-азной обработке согласно инструкции производителя (DNase I, RNase-free, «Fermentas Life Sciences»). Сохранность РНК после обработки ДНКазой проверяли с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer. Реакцию

Таблица 1. Структура праймеров исследуемых генов

Ген	Структура прямого праймера	Структура обратного праймера
Арил-гидрокарбонный рецептор (<i>Ahr</i>)	ATAAACTCACAGTCCGCCATGG	AAGTCGGACGAATAGGTTTCATTG
Цитохром P450 1a1 (<i>Cyp1a1</i>)	CTGAATGGCTTCTATATCCCAAG	AATGGTCTCTCCGATGCACTTTC
Цитохром P450 2b10 (<i>Cyp2b10</i>)	CAGACCGTCAGTCTTTGCGC	AAGGTGGCCCTGTGCTTCTC
Конститутивный рецептор андростанов (<i>Car</i>)	CCATAAAAACCTGAAAGGACTGC	TGCATACAGAAACCGACTTTGG
β -актин (<i>Actb</i>)	ACATGGCATTGTTACCAACTGG	CCTGGATGGCTACGTACATGG

Таблица 2. Фоновое содержание мРНК *Ahr*, *Car* и их генов-мишеней *Cyp1a1* и *Cyp2b10* в печени мышей двух линий

Линии мышей	Исследуемые гены			
	<i>Ahr</i>	<i>Cyp1a1</i>	<i>Cyp2b10</i>	<i>Car</i>
DD/He	1,70 ± 0,24	4,20 ± 1,3	2,90 ± 0,86	1,24 ± 0,09
CC57BR/Mv	1,62 ± 0,47	5,02 ± 1,10	1,28 ± 0,55	2,44 ± 0,33*

Относительное содержание мРНК было оценено с помощью ПЦР-РВ, нормализовано к уровню экспрессии *Actb* и выражено в виде кратных изменений относительно контрольной пробы интактной мыши линии DD/He. Достоверность различий между линиями мышей: * $p < 0,05$. Количество животных в каждой группе – 3.

Таблица 3. Влияние хронического введения OAT на относительное содержание мРНК *Ahr* и *Car* у мышей двух линий

Линии мышей	Группы	<i>Ahr</i>		<i>Car</i>	
		1 сут ^a	4 сут	1 сут	4 сут
DD/He	Контроль	2,04 ± 0,44	1,25 ± 0,09	1,28 ± 0,16	1,03 ± 0,10
	OAT	2,37 ± 0,17	1,88 ± 0,39	2,5 ± 0,64	1,23 ± 0,22
CC57BR/Mv	Контроль	2,44 ± 0,5	1,46 ± 0,23	5,23 ± 0,7***	2,44 ± 0,21*
	OAT	2,12 ± 0,4	1,63 ± 0,13	2,02 ± 0,2 ⁰	1,77 ± 0,22

OAT (225 мг/кг вт) вводили один раз в 2 нед 4-кратно. Контрольная группа получала эквивалентное количество оливкового масла. Относительное содержание мРНК было оценено с помощью ПЦР-РВ и нормализовано к уровню экспрессии *Actb* и выражено в виде кратных изменений относительно контрольной пробы интактной мыши линии DD/He. ^a – время после окончания введения OAT (сут). Достоверность различий между линиями мышей: * $p < 0,05$ и *** $p < 0,001$. Достоверность отличий от группы контроля: ⁰ $p < 0,05$. Количество животных в каждой группе – 3.

обратной транскрипции проводили с помощью набора «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» («Fermentas Life Sciences»). Экспрессию генов оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием «Набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии Sybr Green» (ЗАО «Синтол», г. Москва) на оборудовании ABI Prism 7000 («Applied Biosystems», США) с помощью SDS1.2.3.

Подбор праймеров осуществляли с помощью программ «Primer Express® Software» v2.0 («Applied Biosystems»). Предварительно отобранные пары праймеров верифицировали на специфичность с помощью программ «Primer-BLAST» (NCBI), «Genome Browser» (UCSC) и «In-silico PCR» (UCSC). Для проведения ПЦР-РВ пары праймеров подбирались таким образом, чтобы реакция проходила в унифицированных условиях для всех генов при одновременном сохранении высокой специфичности для каждого гена. Выбранные праймеры должны были детектировать максимальное количество известных вариантов сплайсинга. Отобранные по вышеперечисленным критериям пары характеризовались следующими параметрами: длина специфического ампликона 200 п. о. ± 5 %; температурный

диапазон отжига для всех пар праймеров –58 °C ... –61 °C. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Уровень экспрессии генов был нормализован к уровню экспрессии β -актина (*Actb*). Уровень модуляции экспрессии мРНК дан относительно уровня контрольной пробы интактной мыши линии DD/He.

Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Достоверность различий между исследуемыми группами животных оценивали по t -критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Фоновые уровни экспрессии мРНК *Ahr*, *Cyp1a1* и *Cyp2b10* в печени у мышей исследуемых линий существенно не различались, но содержание мРНК *Car* у резистентных мышей BR было почти в 2 раза выше, чем у DD (табл. 2).

Хроническое введение OAT не влияло на содержание мРНК *Ahr* у мышей обеих линий. В то же время уровень мРНК *Car* существенно снизился у мышей BR по сравнению с контролем через сутки после введения OAT (табл. 3). В конце эксперимента эти различия исчезли.

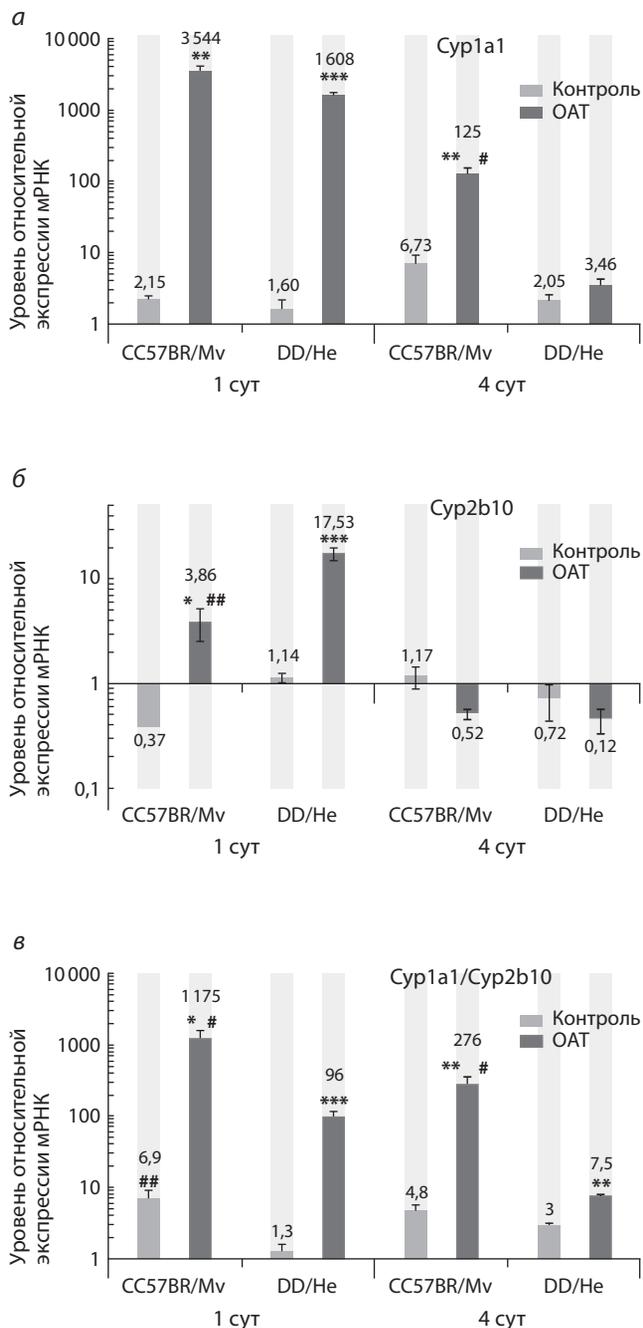


Рис. 1. Влияние хронического введения ОАТ на относительное содержание мРНК Cyp1a1 и Cyp2b10 в печени мышей DD/He и CC57BR/Mv.

ОАТ (225 мг/кг вт) вводили один раз в 2 нед 4-кратно. Контрольная группа получала эквивалентное количество оливкового масла. Относительное содержание мРНК было оценено с помощью ПЦР-РВ и нормализовано к уровню Actb. Данные представлены в виде кратных изменений экспрессии (а) Cyp1a1 и (б) Cyp2b10 относительно контрольной пробы интактной мыши линии DD/He; (в) Cyp1a1 относительно Cyp2b10. Темные столбики – группа животных, получавшая ОАТ, светлые столбики – контрольная группа. Достоверность отличий от группы контроля: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$. Достоверность различий между линиями мышей # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$. Количество животных в каждой группе – 3.

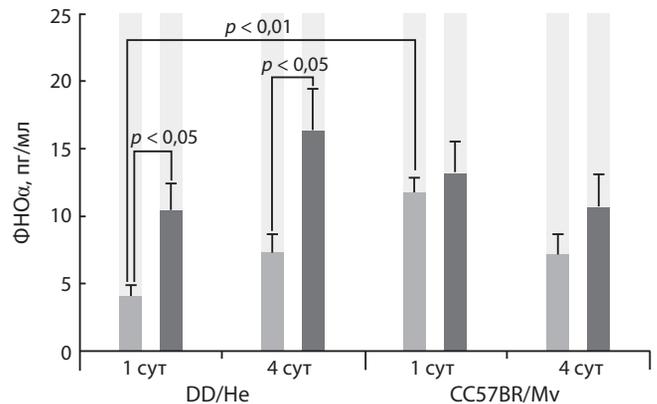


Рис. 2. Влияние хронического введения ОАТ на уровень ФНОα в сыворотке крови мышей DD/He и CC57BR/Mv.

ОАТ (225 мг/кг вт) вводили один раз в 2 нед 4-кратно. Контрольная группа получала эквивалентное количество оливкового масла. Уровень ФНОα определяли на 1-й и 4-й дни после окончания введения препаратов. Светлый столбик – контроль, темный столбик – группа ОАТ. Данные представлены в виде $M \pm m$. Количество животных в каждой группе – 6–8. $p < 0,05$, $p < 0,01$ – значения t -критерия Стьюдента.

У мышей DD изменений в экспрессии Car не было обнаружено. Следует отметить, что у интактных животных так же, как и в контроле, содержание мРНК Car у мышей BR было выше, чем у DD (табл. 2, 3). Чем могут быть обусловлены такие межлинейные различия – вопрос дальнейших исследований.

Через сутки после введения канцерогена у обеих линий наблюдалось значительное увеличение экспрессии мРНК Cyp1a1 и Cyp2b10 – генов-маркеров активации Ahr и Car (Petrick, Klaassen, 2007) (рис 1, а, б). Это соответствует данным литературы о значительном повышении экспрессии этих генов в ответ на однократное введение ОАТ (Cheung et al., 1994; Zacharova et al., 2003; Smetanina et al., 2011). Отметим, что уровень экспрессии Cyp2b10 у чувствительных мышей DD был значительно выше, чем у резистентных мышей BR (рис. 1, б). Активация Car, как известно, промотирует развитие опухолей печени у мышей и крыс (Kolaya et al., 1995; Yamamoto et al., 2004; Huang et al., 2005), поэтому повышенная активация Car у DD может быть причиной их высокой чувствительности к гепатоканцерогенному действию ОАТ. В то же время более низкая индукция Cyp2b10 и снижение экспрессии Car в ответ на введение ОАТ (рис. 1, б, табл. 3) свидетельствуют об относительном подавлении сигнального пути Car у BR по сравнению с DD, что может быть одним из факторов резистентности линии BR.

Другим фактором, влияющим на канцерогенный процесс, является воспаление. В нашем эксперименте хроническое введение ОАТ привело к значительному повышению концентрации ФНОα в крови у мышей DD (рис. 2). Такой эффект наблюдался и через 1, и через 4 сут после окончания введения канцерогена. В отличие от DD, у BR уровень ФНОα не отличался от контроля (рис. 2). Ранее нами было показано, что однократное введение ОАТ вызывает воспалительную реакцию и у DD, и у BR, но у мышей DD продолжительность этой реакции больше

(Багинская и др., 2009). Возможно, хроническое введение канцерогена по-разному влияет на эти линии: вызывает привыкание у резистентных мышей BR, но не снижает воспалительные процессы у мышей DD.

Известно, что хроническое воспаление является фактором гепатоканцерогенеза (Nakagawa, Maeda, 2012), поэтому длительное повышение ФНО α в крови у мышей DD может быть еще одной причиной их высокой чувствительности к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу. Воспаление, как известно, подавляет экспрессию Car и его генов-мишеней (Beigneux et al., 2002; Gerbal-Chaloin, 2013), но в нашем эксперименте, несмотря на высокий уровень индукции ФНО α у мышей DD, подобных эффектов не отмечалось.

По литературным данным, было установлено, что однократное введение ОАТ индуцирует экспрессию *Cyp1a1* у мышей, но однозначных различий между чувствительными и резистентными линиями не было выявлено (Тимофеева и др., 2000; Zacharova et al., 2003). В нашем эксперименте через сутки после окончания введения ОАТ у мышей резистентной линии BR индукция экспрессии *Cyp1a1* была в 2 раза выше, чем у DD, а на 4-е сутки – в 30 раз выше, несмотря на общее снижение этого показателя у обеих линий (рис. 1, а). Это свидетельствует о значимых различиях в индукции *Cyp1a1* и, следовательно, в активации Ahг, между чувствительной и резистентными линиями.

Непрерывная активация Ahг, как известно, стимулирует развитие опухолей печени (Moennikes et al., 2004). Однако именно у резистентных мышей BR мы наблюдали значительное и длительное повышение этого рецептора. Возможно, что у BR были задействованы другие, чем у DD, гены-мишени каскада Ahг и регуляторных факторов, связанных с ним. Известно, что активация Ahг может оказывать антиканцерогенное действие путем ингибирования пролиферации клеток и стимуляции апоптоза (Mitchell et al., 2006; Fan et al., 2010), а также за счет модуляции воспалительных сигналов путем подавления экспрессии воспалительных цитокинов и прямого взаимодействия с RelB субъединицей NF- κ B (Tian et al., 1999; Vogel, Matsumura, 2009; Hanieh, 2014). Возможно, подавление воспаления, вызванное активацией Ahг, является одним из факторов резистентности у BR. Другим фактором резистентности может быть повышение Ahг-опосредованной индукции ферментов метаболизма, в результате чего происходит преимущественная детоксикация и выведение ОАТ, но не его активация. Такая возможность описана в работе Неберта с соавт. (Nebert et al., 2004), в которой выдвинуто предположение о преобладании детоксификационной функции *Cyp1a* ферментов у мышей. Недавние данные по уменьшению числа и размеров опухолей печени после метаболической активации ОАТ подтверждают это предположение (Каледин, Ильницкая, 2011). Таким образом, наши результаты и данные литературы дают основания полагать, что значительная активация Ahг у мышей BR подавляет воспаление и ускоряет выведение ОАТ, что ведет к повышению их резистентности к гепатоканцерогенезу.

Мы предположили, что баланс между активностью сигнальных путей Ahг и Car влияет на чувствительность к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу. Показателем

этого может быть оценка экспрессии мРНК *Cyp1a1* относительно мРНК *Cyp2b10* (соотношение *Cyp1a1/Cyp2b10*). После введения ОАТ было отмечено значительное увеличение этого соотношения у обеих линий (рис. 1, в). Однако у BR этот показатель был достоверно выше, чем у DD, причем не только в группах с введением ОАТ, но и в контроле (рис. 1, в). Аналогичное соотношение было найдено и у интактных животных ($1,52 \pm 0,33$ у DD против $6,69 \pm 0,92$ у BR, $p < 0,0004$). Эти данные свидетельствуют, что соотношение *Cyp1a1/Cyp2b10* может быть полезным для оценки чувствительности линий мышей к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу.

На основании полученных результатов можно предположить, что преобладание сигнального пути Ahг над сигнальным путем Car определяет резистентность к ОАТ-индуцированному гепатоканцерогенезу и что данный механизм опосредуется через регулирование интенсивности воспаления и скорость метаболизма ОАТ.

Благодарности

Работа выполнена по базовым бюджетным проектам № VI.58.1.2 и VI.60.1.1 при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), а также гранта РФФИ № 11-04-00545-а.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Багинская Н.В., Ильницкая С.И., Никитенко Е.В., Каледин В.И. Промотирующее влияние орто-аминоазотолуола на гепатоканцерогенез сопровождается усилением воспалительных и пролиферативных процессов в ткани печени и снижением концентрации свободного тироксина в крови. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2007;144(12):672-676.
- Багинская Н.В., Перепечаева М.Л., Хоценко О.М., Душкин М.И. Влияние орто-аминоазотолуола на экспрессию генов PPAR- α , PPAR- γ , RXR- α и CAR в печени и уровень ИЛ-1 β в крови у мышей контрастных по чувствительности к химическому гепатоканцерогенезу линий. Рецепция и внутриклеточная сигнализация. Пушино, 2009:1326-330.
- Каледин В.И., Серова И.А., Семенова Л.А. Неодинаковая предрасположенность к развитию спонтанных и индуцированных опухолей печени у мышей разных линий и их гибридов. Эксперим. онкология. 1990;12(4):28-30.
- Каледин В.И., Ильницкая С.И. Торможение метаболизма стимулирует, а активация метаболизма ингибирует канцерогенное действие орто-аминоазотолуола на печень мышей. Вopr. онкологии. 2011;57:216-220.
- Тимофеева О.А., Филипенко М.Л., Рыкова Н.А., Гуляева Л.Ф., Ляхович В.В. Экспрессия CYP1A в печени мышей линий A/SN и CC57BR, различающихся по чувствительности к гепатоканцерогенному действию о-аминоазотолуола. Биохимия. 2000;65(6):842-847.
- Beigneux A.P., Moser A.H., Shigenaga J.K., Grunfeld C., Feingold K.R. Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. Biochem. Biophys Res. Commun. 2002;293:145-149.

- Chen C.J., Chen D.S. Interaction of hepatitis B virus, chemical carcinogen, and genetic susceptibility: Multistage hepatocarcinogenesis with multifactorial etiology. *Hepatology*. 2002;36:1046-1049.
- Cheung Y.L., Puddicombe S.M., Gray T.J., Ioannides C. Mutagenicity and CYP1A induction by azobenzenes correlates with their carcinogenicity. *Carcinogenesis*. 1994;15:1257-1263.
- Fan Y., Boivin G.P., Knudsen E.S., Nebert D.W., Xia Y., Puga A. The aryl hydrocarbon receptor functions as a tumor suppressor of liver carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010;70:212-220.
- Feo F., De Miglio M.R., Simile M.M., Muroli M.R., Calvisi D.F., Frau M., Pascale R.M. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;1765:126-147.
- Gerbal-Chaloin S., Jankova I., Maurel P., Daujat-Chavanieu M. Nuclear receptors in the cross-talk of drug metabolism and inflammation. *Drug Metab. Rev.* 2013;45(1):122-144.
- Glass C.K., Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2010;10:365-376. DOI: 10.1038/nri2748
- Hanieh H. Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends. *Biomed. Res. Int.* 2014. DOI: 10.1155/2014/520763
- Huang W., Zhang J., Washington M., Liu J., Parant J.M., Lozano G., Moore D.D. Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol. Endocrinol.* 2005;19:1646-1653.
- Kolaya K.L., Stevenson D.E., Walborg Jr. E.F., Klaunig J.E. *Cancer Biology*: Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis. *Carcinogenesis*. 1995;17:947-954.
- Liedtke C., Trautwein C. The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer. *Eur. J. Cell Biol.* 2012;91(6/7):582-589. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.10.001
- Marlowe J.L., Puga A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J. Cell Biochem.* 2005;96:1174-1184.
- Mikhailova O.N., Vasyunina E.A., Ovchinnikova L.P., Gulyaeva L.F., Timofeeva O.A., Filipenko M.L., Kaledin V.I. o-Aminoazotoluene does induce the enzymes of its own mutagenic activation in mouse liver. *Toxicology*. 2005;211:132-138.
- Miller E.C., Miller J.A. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*. 1981;47(10):2327-2345.
- Mitchell K.A., Lockhart C.A., Huang G., Elferink C.J. Sustained aryl hydrocarbon receptor activity attenuates liver regeneration. *Mol. Pharmacol.* 2006;70(1):163-170.
- Moennikes O., Loeppen S., Buchmann A., Andersson P., Itrich C., Poellinger L., Schwarz M.A. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 2004;64:4707-4710.
- Nakagawa H., Maeda S. Inflammation- and stress-related signaling pathways in hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2012;18(31):4071-4081.
- Nebert D.W., Dalton T.P., Okey A.B., Gonzalez F.J. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 2004;279:23847-23850.
- Patel R.D., Hollingshead B.D., Omiecinski C.J., Perdew G.H. Aryl hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver. *Hepatology*. 2007;46:209-218.
- Patrick J.S., Klaassen C.D. Importance of hepatic induction of constitutive androstane receptor and other transcription factors that regulate xenobiotic metabolism and transport. *Drug Metab. Dispos.* 2007;35(10):1806-1815.
- Smetanina M.A., Pakharukova M.Y., Kurinna S.M., Dong B., Hernandez J.P., Moore D.D., Merkulova T.I. Ortho-aminoazotoluene activates mouse constitutive androstane receptor (mCAR) and increases expression of mCAR target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011;255:76-85.
- Tian Y., Ke S., Denison M.S., Rabson A.B., Gallo M.A. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem.* 1999;274:510-515.
- Vogel C.F., Matsumura F. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family. *Biochem. Pharmacol.* 2009;77:734-745.
- Xie W., Yeuh M.F., Radomska-Pandya A., Saini S.P., Negishi Y., Bottruff B.S., Cabrera G.Y., Tukey R.H., Evans R.M. Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003;100:4150-4155.
- Yamamoto Y., Moore R., Goldsworthy T.L., Negishi M., Maronpot R.R. The orphan nuclear receptor constitutive active androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer Res.* 2004;64(20):7197-7200.
- Zacharova L.Yu., Gulyaeva L.F., Lyakhovich V.V., Mikhailova O.N., Timofeeva O.A., Filipenko M.L., Kaledin V.I. Cytochrome P4501A1 and 1A2 gene expression in the liver of 3-methylcholanthrene- and o-aminoazotoluene-treated mice: a comparison between PAH-responsive and PAH-nonresponsive strains. *Toxicol. Sci.* 2003;73:108-113.

Модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 на мышах линии nude для исследования онколитической активности вируса осповакцины

Г.В. Кочнева¹, А.А. Гражданцева¹, Г.Ф. Сиволобова¹, А.В. Ткачева^{1,2}, А.Н. Швалов¹, А.Ю. Юнусова², Е.И. Рябчикова², С.В. Нетесов^{1,3}

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Мышам линии nude подкожно прививали клетки карциномы человека A431 в двух удаленных друг от друга точках. Один из двух сформировавшихся ксенографтов использовали для лечения рекомбинантным вирусом осповакцины, а второй служил искусственным метастазом. В работе использовали аттенуированный рекомбинантный вирус осповакцины (BOB) VVdGF-GFP2, штамм Л-ИВП (GenBank accession number KP233807), с делециями двух генов вирулентности – вирусного ростового фактора и тимидинкиназы, в район которой был встроен ген зеленого флюоресцентного белка GFP2. Лечение проводили путем однократного введения внутрь опухоли рекомбинантного BOB в дозе 10^7 БОЕ/мышь. Вирус обнаруживался в клетках искусственного метастаза уже через двое суток после инфицирования, а через 8 сут достигал концентраций, сравнимых с инфицированной опухолью ($\sim 10^9$ БОЕ/мл). Ультраструктурное исследование показало избирательное размножение рекомбинантного вируса в опухолевых клетках. Адресное накопление GFP2 в узлах опухоли и метастаза продемонстрировано на УФО-изображениях мышей, полученных с использованием In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Германия). Полная деструкция ткани опухоли регистрировалась через 12 сут, а метастаза – через 20 сут после инъекции VVdGF-GFP2. В обоих случаях деструкция сопровождалась выраженным отеком и лейкоцитарной инфильтрацией ксенографтов. Рекомбинантный вирус индуцировал значимое уменьшение размеров опухоли и метастаза, к окончанию эксперимента (35-е сут) размер ксенографтов контрольных мышей в 10 раз превышал аналогичный параметр леченных ($5\,000$ против 500 мм^3). Проведенное исследование показывает, что аттенуированный BOB даже при локальном периферическом способе введения не только способен разрушать ткань первичного опухолевого узла, но и обладает отчетливым антиметастатическим действием.

Ключевые слова: рекомбинантный вирус осповакцины; карцинома человека A431; ксенографт; модельный метастаз; онколитическая активность.

A model of the artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for examination of the oncolytic activity of vaccinia virus

G.V. Kochneva¹, A.A. Grazhdantseva¹, G.F. Sivolobova¹, A.V. Tkacheva^{1,2}, A.N. Shvalov¹, A.Yu. Unusova², E.I. Ryabchikova², S.V. Netesov^{1,3}

¹ The State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Novosibirsk region, Koltsovo, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Human carcinoma A431 cells were subcutaneously injected into nude mice at points remote from each other. One of the two xenografts developed afterwards was used for treatment with a recombinant vaccinia virus, while another served as an artificial metastasis. We used the attenuated recombinant vaccinia virus (VACV) VVdGF-GFP2 of the L-IVP strain (GenBank accession number KP233807), with deletion of two virulence genes: the virus growth factor and thymidine kinase, with the gene for the green fluorescent protein (GFP2) inserted in an area of the latter. Treatments was performed by a single intratumoral injection of the recombinant VACV at a dose of 10^7 PFU/mouse. VACV was detected in cells of the artificial metastasis as early as two days following infection, and after 8 days virus concentrations were comparable with those in the infected tumor ($\sim 10^9$ PFU/ml). Electron microscopy revealed selective replication of the recombinant in tumor cells. Targeted accumulation of GFP2 in both tumor and metastasis was shown in the UV-images of the mice obtained using the In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Germany). Complete destruction of the tumor was registered after 12 days, and that of metastasis, after 20 days post injection of VVdGF-GFP2. The destruction process was accompanied by pronounced edema and leukocyte infiltration of tumor tissue. The recombinant virus induced a significant reduction in the sizes of the tumor and metastasis:

by the end of the experiment (35 days) the xenografts in the control mice were 10 times larger than those in the treated mice (5 000 vs. 500 mm³). Our study showed that the attenuated VACV administered by the peripheral route not only is able to destroy the primary tumor, but also has a distinct antimetastatic action.

Key words: recombinant vaccinia virus; human carcinoma A431; xenografts; metastasis model; oncolytic activity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Ткачева А.В., Швалов А.Н., Юнусова А.Ю., Рябчикова Е.И., Нетесов С.В. Модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека А431 на мышах линии nude для исследования онколитической активности вируса осповакцины. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):480-486. DOI 10.18699/VJ15.064

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Shvalov A.N., Unusova A.U., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. A model of the artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for examination of the oncolytic activity of vaccinia virus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):480-486. DOI 10.18699/VJ15.064

Вирус осповакцины (ВОВ) в настоящее время широко используется для создания противоопухолевых препаратов (Кочнева и др., 2012). Это объясняется, прежде всего, его природными онколитическими и иммуногенными свойствами, безопасностью для человека и возможностью модификации генома, а также способностью системно распространяться по организму и накапливаться в клетках модельных опухолей (Breitbach et al., 2012). Для предотвращения возможных осложнений у иммунодефицитных больных в онкотерапии используются аттенуированные штаммы ВОВ. Показано, что элиминация генов тимидинкиназы (*tk*) и ростового фактора (*VGF* – virus growth factor) ВОВ приводит к практически полному отсутствию репликации вируса в неделящихся клетках (McCart et al., 2007), при этом эффективность разрушения раковых клеток такими двойными мутантами (VVdd) не отличается от исходного штамма (Thorne et al., 2007).

В то же время аттенуация снижает способность штаммов ВОВ к диссеминации по организму, и даже штаммы высокопатогенных для своих хозяев ортопоксвирусов, таких как вирус оспы мышей (ectromelia), дефектные по тимидинкиназе, репродуцируются и выявляются только в месте введения (Kochneva et al., 1994). Тем не менее дефектные по тимидинкиназе мутанты ВОВ при внутривенном введении способны достигать опухолей человека и размножаться в них (Thorne et al., 2007). Однако количество вируса, попадаемое в опухоль при внутривенном введении, очень мало, и требуется достаточно много времени, для того чтобы проявился онколитический эффект (Weibel et al., 2011), а также введение высоких доз вируса (Breitbach et al., 2011). Кроме того, было показано, что негативный по тимидинкиназе вирус осповакцины способен инфицировать клетки эндотелия сосудов и эффективно разрушать васкуляризацию опухоли (Breitbach et al., 2013). Механизм такого разрушения до конца не выяснен, поэтому существует вероятность повреждения сосудов в других органах и тканях организма, а внутривенное введение больших доз вируса осповакцины может негативно сказываться на организме в процессе лечения.

Эффективность внутриопухолевого введения аттенуированных вариантов ВОВ была показана на широком наборе опухолей человека (Haddad et al., 2012), однако антиметастатический эффект при таком способе введе-

ния изучен недостаточно. В данной работе предложена модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека А431 в виде двух подкожных ксенографтов, привитых одной и той же мышце линии nude. Структура ксенографтов карциномы А431 была нами изучена ранее (Юнусова и др., 2014). Показано, что ксенографты (опухолевые узлы) карциномы А431 окружены соединительнотканной капсулой, которая обеспечивает неинвазивность опухоли в организме мышей. Для оценки онколитической активности был сконструирован двойной рекомбинантный вариант ВОВ (VVdGF-GFP2) с делециями *VGF*-гена (фенотип VGF⁻) и *tk*-гена (фенотип TK⁻). В район делеции *tk*-гена дополнительно введен репортерный ген, экспрессирующий зеленый флюоресцентный белок GFP2 (фенотип GFP⁺). Вирус вводили интрамурально только в один ксенографт карциномы А431, второй же использовали в качестве искусственного метастаза.

Цель исследования заключалась в оценке диссеминации аттенуированного вируса осповакцины VVdGF-GFP2 с фенотипом VGF⁻TK⁻/GFP⁺ в органы nude мышей и динамики его накопления в опухоли и модельном метастазе на основе ксенографтов эпидермоидной карциномы А431.

Материалы и методы

Клетки почки африканской зеленой мартишки CV-1, дефектные по тимидинкиназе фибробласты эмбриона крысы Rat2 TK⁻, и клетки эпидермоидной карциномы человека А431 выращивали на среде ДМЕМ (Invitrogen) с добавлением 10 %-й эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone).

Вирус осповакцины со встройкой гена улучшенного варианта зеленого флюоресцентного белка GFP2 в структурной части *tk*-гена получали методом гомологичной рекомбинации между ДНК ВОВ штамма VVdGF2/6 с делецией гена *C11R* (Кочнева и др., 2013) и плазмидной ДНК рXJP5.2-GFP2 в цитоплазме клеток CV-1 и последующей селекции рекомбинантов в клетках Rat2 TK⁻ с добавлением в культуральную среду бромдезоксипуридина по методике, описанной ранее (Kochneva et al., 1994). Трансфекцию плазмидной ДНК проводили с использованием набора Lipofectamine™ с реагентом Plus (Life Technology) и культуральной среды Opti-MEM (Invitrogen). Для конструирования плазмиды рXJP5.2-GFP2 первоначально

была создана плаزمида рХJP5.2, которая обеспечивает встройку трансгенов в район *tk*-гена вируса за счет наличия в ней фрагмента ДНК ВОВ, соответствующего позициям нуклеотидов 80682–81277 депонированного нами в GenBank штамма Л-ИВП (Accession number KP233807), разделенного на левый (595 п. н., позиции 80682–81277) и правый (933 п. н., позиции 81307–82251) фланки с делецией 30 п. н. в центре *tk*-гена, в район которой введены природный промотор ВОВ р7.5К (276 п. н.) (Cochran et al., 1985) и полилинкер HindIII-EcoRI из плазмиды рUC19 (GenBank accession number M77789.2) для встройки трансгенов. Ген *GFP2* был выделен из коммерческой плазмиды рTagGFP2-C (Evrogen) и перенесен в полилинкер рХJP5.2 с получением плазмиды рХJP5.2-GFP2. Структура плазмиды подтверждена секвенированием.

Клонирование рекомбинантов проводили методом бляшек на монослое клеток CV-1 под твердым агаровым покрытием. Материал каждой изолированной бляшки помещали в пенициллиновые флаконы с монослоем клеток CV-1 и подращивали до образования ЦПЭ. Затем флаконы трижды замораживали/оттаивали, из 100 мкл криолизата выделяли ДНК с использованием набора ДНК-сорб-В (ИнтерЛабСервис) и анализировали методом ПЦР. Для скрининга рекомбинантов со встройкой гена *GFP2* была рассчитана и синтезирована пара праймеров:

TKVVsense 20 п. н. 5' cgatgtcttcgcagatgat 3'

TK2 internal antisense 20 п. н. 5' ttctgtgagcgtatggcaaa 3'.

Условия проведения ПЦР: 94° – 2 мин – 1 цикл, 94° – 10 с, 58° – 30 с – 29 циклов, 72° – 2,5 мин, 72° – 1 цикл.

Праймер TKVVsense расположен на вирусном геноме слева от фланкирующей последовательности плазмиды рХJP5.2-GMCSF и «привязывает» встройку гена *GFP2* непосредственно к вирусной ДНК. Праймер TK2 internal antisense лежит внутри правого фланкирующего фрагмента вирусного генома, который является общим для плазмиды рХJP5.2-GFP2 и вирусной ДНК. С использованием вышеуказанных праймеров с ДНК рекомбинантного вируса амплифицируется фрагмент размером 1962 п. н., а с ДНК исходного штамма VVdGF2/6 – фрагмент 716 п. н.

Отобранный рекомбинантный вариант VVdGF-GFP2 дважды реклонировали, чтобы очистить от возможных следовых примесей родительского вируса, и секвенировали район рекомбинации для подтверждения правильности структуры. Для оценки экспрессии гена *GFP2* монослой клеток CV-1 инфицировали рекомбинантным вирусом, инкубировали 48 ч, отмывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали изо-пропанолом. Сканирование бляшек проводили с помощью микроскопа «Axiovert» 40 CFL ZEISS с использованием люминесцентных светофильтров 09 (широкополосный для зеленой люминесценции). Далее вирус с подтвержденной структурой и экспрессией гена *GFP2* нарабатывали на клетках CV-1 и очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (25–40 %). Титр вируса определяли методом бляшек на монослое клеток CV-1, окрашенном фиксирующим раствором кристаллического фиолетового (2 г/л кристаллический фиолетовый, 50 мл/л формальдегид, 100 мл/л этанол, вода). Очищенный рекомбинантный штамм ВОВ VVdGF-GFP2 с титром 10⁹ БОЕ/мл хранили до использования в расфасованном виде при –80 °С.

Мыши линии nude получены из филиала Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова НПП «Питомника лабораторных животных» (Московская область, г. Пущино). При выполнении исследований соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755). Животных содержали в боксированных помещениях с дополнительной фильтрацией и стерилизацией воздуха.

В работе использовали самок в возрасте 6–8 нед, весом 14–18 г. Суспензию клеток карциномы человека А431 (5 × 10⁶ клеток/мышь в 100 мкл 0,9 % NaCl) вводили подкожно в правый и левый бочок мыши, ближе к бедру. Время формирования опухолей (ксенографтов) составляло 10–12 дней. «Лечение» начинали, когда объем опухолей достигал 100–150 мм³. Вирус вводили интратуморально в опухоль на левом бочке в дозе 10⁷ БОЕ/мышь в 100 мкл 0,9 %-го NaCl. [В статье термин «опухоль» будет использован для обозначения инфицированного ксенографта, а неинфицированный ксенографт будет обозначаться термином «метастаз».] Мышам контрольной группы в опухоль вводили 100 мкл 0,9 %-го NaCl. Мониторинг состояния мышей осуществляли 2 раза в неделю, объем опухоли рассчитывали по формуле $L \times W^2 \times 0,5$ (Yu et al., 2009). Общий период наблюдения составил 35 дней от начала «лечения». Двух мышей опытной группы через 12 дней после введения вируса анализировали в In-Vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Германия). Для анализа мышей усыпляли введением ксилазина (20 мг/кг в/м), затем делали рентгеновские снимки в разных позициях, с которыми совмещали УФО-изображения с использованием ПО MS FX PRO.

В период со вторых по 35-е сут каждые 2–3 сут умерщвляли по две мыши и забирали образцы инфицированной опухоли и метастаза, селезенку, печень, легкие, почки и кровь. 10 %-е гомогенаты органов и тканей (v/v) готовили в 0,9 %-м растворе NaCl, обрабатывали ультразвуком, центрифугировали и титровали методом бляшек на монослое клеток CV-1. Для микроскопического исследования использовали ксенографты, иссеченные в период с 4-х по 30-е сут после введения вируса.

Образцы для световой микроскопии обезживали стандартным методом с использованием гистологического автомата Sakura Tissue-Tek II (Sakura, Япония) и заливали в парафин. Сагиттальные срезы (3–4 мкм) опухоли и метастаза окрашивали гематоксилин-эозином, или по методу микро-Маллори (использовали готовый набор, Bio-Optica, Италия), затем заключали в среду Bio Mount (Bio-Optica, Италия). Парафиновые срезы анализировали в световом микроскопе Leica DM 2500 с цифровой камерой Leica DFC420C (Leica, Германия).

Для электронной микроскопии фиксированные в 4 %-м параформальдегиде ксенографты нарезали полосками толщиной 1–2 мм и постфиксировали в 1 %-м растворе четырехоксида осмия (SPI, США), обезживали стандартным методом и заливали в смесь эпон-аралдит (SPI, США). С блоков изготавливали полутонкие срезы, которые окрашивали Азуром 2, просматривали в световом микроскопе Leica DM 2500 (Лейка, Германия) и выбирали участки для прицельной заточки пирамид. С заточенных

пирамид на ультратоме Leica EM UC7 изготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали растворами цитрата свинца и уранилацетата (SPI, США). Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Джеол, Япония). Фотосъемку производили с помощью цифровой камеры бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

Результаты

Поскольку ВОВ является инфекционным для человека, в ряде случаев после вакцинации, проводимой в качестве профилактической меры по борьбе с натуральной оспой, у вакцинированных людей наблюдались серьезные осложнения (Маренникова, Щелкунов, 1998). Риск для здоровья человека или животных, связанный с применением данного вируса в качестве лекарственного препарата, может быть снижен при использовании высокоаттенуированного (ослабленного) штамма вируса осповакцины. Такой высокоаттенуированный штамм VVdGF-GFP2 был сконструирован нами в данной работе. VVdGF-GFP2 представляет собой двойной рекомбинантный вариант ВОВ, российский штамм Л-ИВП, с делециями двух генов факторов вирулентности – *VGF* и *tk*. В район делеции *tk*-гена дополнительно был введен репортерный ген, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок GFP2.

Для оценки антиметастатической активности VVdGF-GFP2 при периферическом интратуморальном способе введения мы использовали пары удаленных друг от друга ксенографтов эпидермоидной карциномы человека А431, трансплантированные подкожно мышам линии nude. При таком способе трансплантации карцинома А431 развивается только в месте прививки у мышей и при введении вируса в один ксенографт («опухоль»), второй можно рассматривать как «метастаз» и использовать для оценки адресности распространения и онколитической активности вируса. На рис. 1 представлена динамика накопления рекомбинантного вируса в органах и тканях мышей. Как следует из этого рисунка, вирус регистрируется в крови уже через 24 ч после инфицирования, а через двое суток он

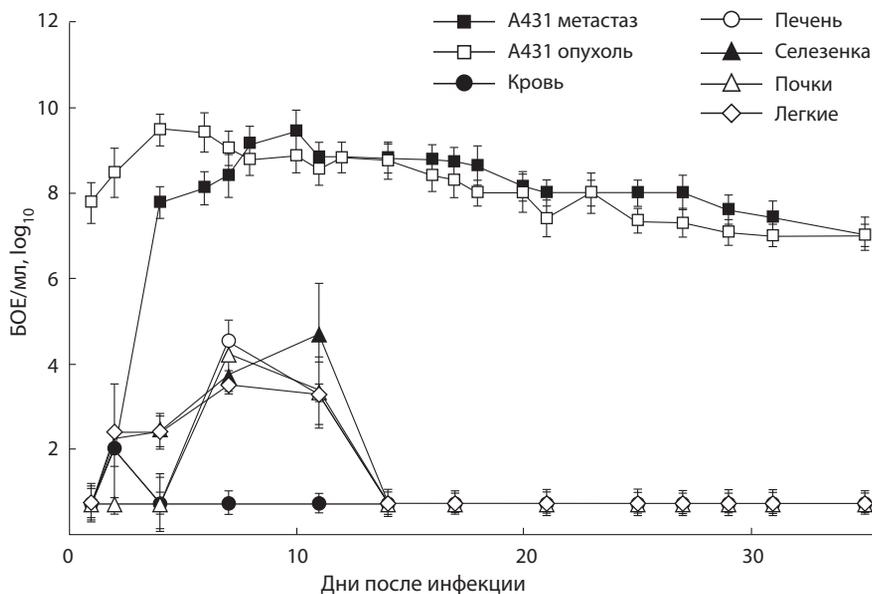


Рис. 1. Динамика накопления рекомбинантного штамма VVdGF-GFP2 в опухоли, метастазе, крови и органах мышей линии nude при интратуморальном введении.

Нижняя линия – предел чувствительности метода (около 10 БОЕ/мл). Стандартное отклонение рассчитывали для $p < 0,05$.

выявляется в неинфицированном метастазе. Вирус также обнаруживается в селезенке, легких, печени и почках через 2–12 сут после инфицирования, однако к 14-м сут вирус регистрируется только в ксенографтах А431 и сохраняется там до 35 сут (период наблюдения). Через двое суток после инфицирования вирус в небольшом титре (10^2 БОЕ/мл) также выявляется в крови, куда он, по-видимому, проникает вследствие повреждения тканей при уколе.

Наличие вируса в крови практически сразу после введения указывает на возможность его системного распространения по организму мыши, о чем свидетельствует и динамика накопления вируса в органах мышей, включая неинфицированный ксенографт А431. Вторичной вирусемии не наблюдается в течение всего периода исследования (35 дн.), что, очевидно, связано с низким уровнем репликации аттенуированного штамма VVdGF-GFP2 и быстрым клиренсом вируса из органов мышей, а также с его строгой внутриопухолевой локализацией (рис. 2).

Как следует из рис. 2, через 12 сут после инфицирования интенсивная флуоресценция наблюдается как в районе опухоли (рис. 2, а), так и метастаза (рис. 2, б). На рис. 2, а видно также небольшое свечение в районе легких мышей, что согласуется с данными рис. 1. Через 12 сут после инфицирования вирус регистрируется в легких в концентрации 10^3 БОЕ/мл 10 %-го гомогената органа, однако в дальнейшем накопления вируса не происходит, и через 15 сут он в легких не обнаруживается.

Исследование ультратонких срезов выявило репродукцию вируса в опухолевых клетках как инфицированных опухолей, так и неинфицированных метастазов (рис. 3, а, б). Рекомбинантный вирус VVdGF-GFP2 имеет типичные для ВОВ морфологические признаки репродукции: в цитоплазме инфицированных клеток регистрируются зернистая вироплазма, скопления незрелых вирусных частиц округлой формы и зрелых вирусных частиц овальной формы (рис. 3, в). На ультратонких срезах опухолей, иссеченных через 4 сут после инфицирования, отмечаются активная репродукция вируса и большое количество вирусных частиц в цитоплазме клеток, а также в межклеточном веществе и среди детрита. В то же время на ультратонких срезах метастазов морфологические признаки репродукции вируса регистрируются лишь через 12 сут после инфицирования. Некоторое расхождение с результатами биотитрования вируса, очевидно, обусловлено меньшей чувствительностью метода ультратон-

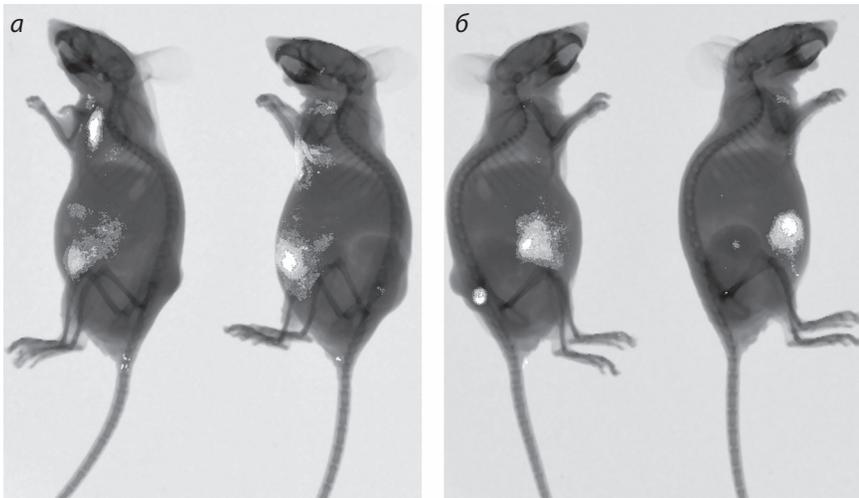


Рис. 2. УФО-изображения мышей, полученные с использованием In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Германия), через 12 сут после инфицирования.
а – инфицированные вирусом VVdGF-GFP2 опухоли; б – неинфицированные метастазы.

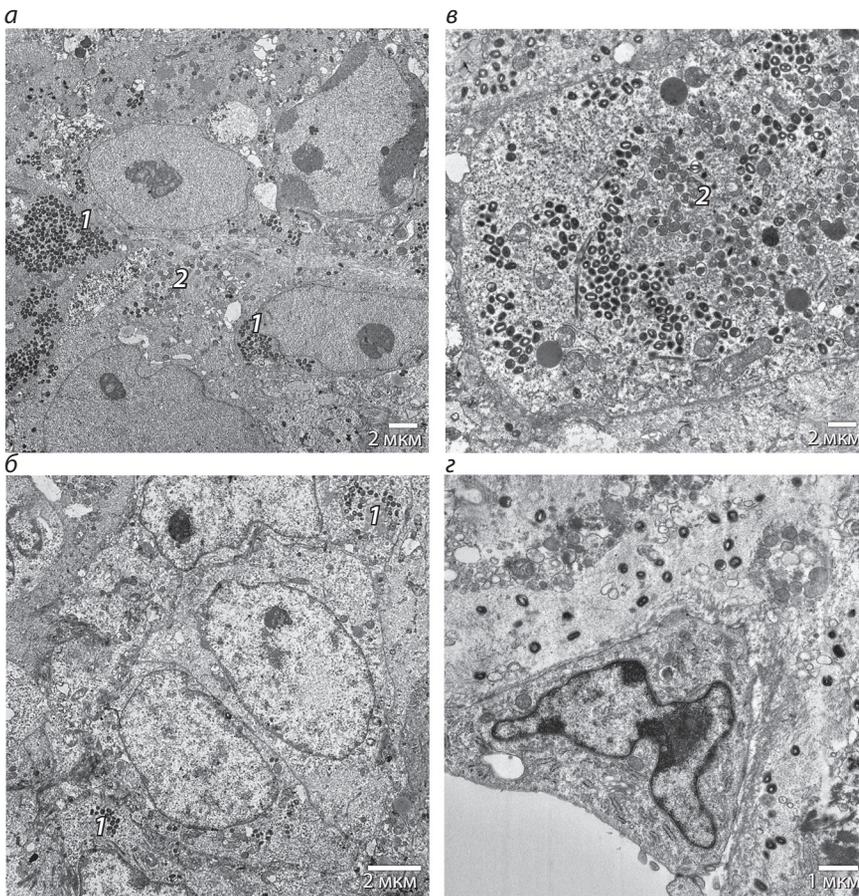


Рис. 3. Репродукция вируса в клетках опухоли (карцинома A431) (а) и метастаза (б, в), иссеченных через 4 и 12 сут после интратуморальной инъекции вируса соответственно; г – эндотелиоцит без признаков репродукции ВОВ.
1 – зрелые вирусные частицы, 2 – незрелые. Ультратонкие срезы.

ких срезов. Рекомбинантный вирус VVdGF-GFP2 размножается только в опухолевых клетках. Морфологических признаков репродукции вируса в клетках стромы ксенографтов (фибробласты, эндотелиоциты) не выявлено. На рис. 3 представлен фрагмент эндотелиоцита инфицированной опухоли, морфологические признаки инфекции в нем отсутствуют.

Результаты измерения объема опухоли и метастаза, представленные на рис. 4, показывают, что вирус VVdGF-GFP2 вызывает значимое уменьшение размеров опухоли и метастаза, начиная с 25-х сут после инфицирования в сравнении с контролем. При этом динамика роста опухоли и метастаза несколько различается. Так, опухоль после небольшого увеличения в течение 7 сут стабилизируется в объеме на протяжении остального периода наблюдения (35 сут), в то время как метастаз продолжает увеличиваться до 17 сут, после чего отмечается уменьшение объема. К 30-м сут различия в динамике роста опухоли и метастаза практически нивелируются. Контрольная опухоль, в которую вводили 0,9 %-й NaCl, и соответствующий метастаз увеличивались в размере в течение всего периода наблюдения.

Светооптическое исследование ксенографтов, иссеченных в динамике эксперимента, показало, что введение рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 в один из них приводит к деструкции опухолевой ткани как в опухоли, так и в метастазе. Деструкция в опухоли происходит постепенно, в каждой последующей точке наблюдения, начиная с 4-х сут, на парафиновых срезах отмечаются увеличение очага деструкции и уменьшение участков визуально неповрежденной ткани. Деструктивные изменения опухолевой ткани в метастазах отмечаются через 6 сут после введения вируса, тогда как через 4 сут явных морфологических изменений не наблюдалось. Полная деструкция ткани опухоли регистрируется через 12 сут, а метастаза – через 20 сут после инъекции рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2: на парафиновых срезах опухолей, иссеченных в этот период времени и позднее, отсутствуют опухолевые клетки, сохраняющие целостность. Таким образом, по срав-

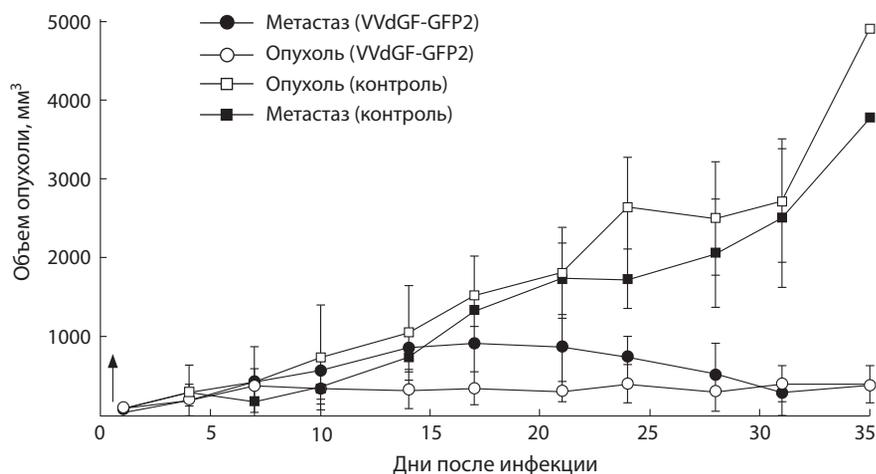


Рис. 4. Ингибирование роста ксенографтов карциномы человека A431 рекомбинантным штаммом VVdGF-GFP2.

Стрелкой указана точка начала измерения (1 сут). Метастаз (контроль) и опухоль (контроль) – метастаз и опухоль мышей, в опухоль которых вводили 0,9 %-й NaCl. Метастаз (VVdGF-GFP2) и опухоль (VVdGF-GFP2) – метастаз и опухоль мышей, леченных рекомбинантным вирусом. Стандартное отклонение рассчитывали для $p < 0,05$.

нению с опухолями, деструкция опухолевых клеток в метастазах происходит с некоторым временным сдвигом, что, очевидно, обусловлено более поздним попаданием вируса в ксенографт и меньшим его количеством.

Морфологические характеристики деструкции опухолевых узлов карциномы A431 при репродукции рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 аналогичны описанным нами ранее при введении штамма Л-ИВП BOB (Kochneva et al., 2014), но имеют ряд особенностей: выражен отек разрушенной ткани, детрит имеет преимущественно ячеистую структуру, в нем часто встречаются полости, что свидетельствует о накоплении жидкости в разрушенной ткани ксенографтов (рис. 5, а), стенки некоторых кровеносных сосудов расслаиваются, лейкоциты (в основном нейтрофилы) регистрируются между слоями в стенке сосудов и в периваскулярной ткани, в детрите встречаются отдельные небольшие скопления лейкоцитов (рис. 5, б).

Таким образом, однократное интратуморальное введение рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 приводит к деструкции и опухоли, и метастаза. Скорость деструкции опухолевой ткани при репродукции этого вируса заметно меньше, чем в случае штаммов Л-ИВП и VVdGF-Apo24S/2 (Kochneva et al., 2014). Так, полная деструкция опухоли отмечается через 8 сут после введения 10^7 БОЕ/мышь штамма VVdGF-Apo24S/2 или Л-ИВП, тогда как после введения той же дозы вируса VVdGF-GFP2 полная деструкция наблюдается через 12 сут. Различия, очевидно, связаны с большей аттенуацией вируса VVdGF-GFP2 в сравнении со штаммом VVdGF-Apo24S/2, который имеет делецию только одного гена *VGF*. Морфологические параметры деструкции ксенографтов после введения рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 существенно не отличаются от таковых после введения рекомбинантного штамма VVdGF-Apo24S/2 или исходного штамма Л-ИВП. Характерными признаками являются более выраженные отек и лейкоцитарная инфильтрация разрушенной опухолевой ткани.

Обсуждение

Для оценки онколитической активности в работе был сконструирован рекомбинантный вирус VVdGF-GFP2, штамм BOB Л-ИВП (GenBank KP233807), с делецией *VGF* и *tk*-генов (фенотип ТК-VGF⁻). Известно, что удаление именно этих генов способствует значительной аттенуации вируса и усилению адресности его онколитической активности (McCart et al., 2007). Для визуализации накопления вируса в клетках опухолевого узла и метастаза в *tk*-ген двойного

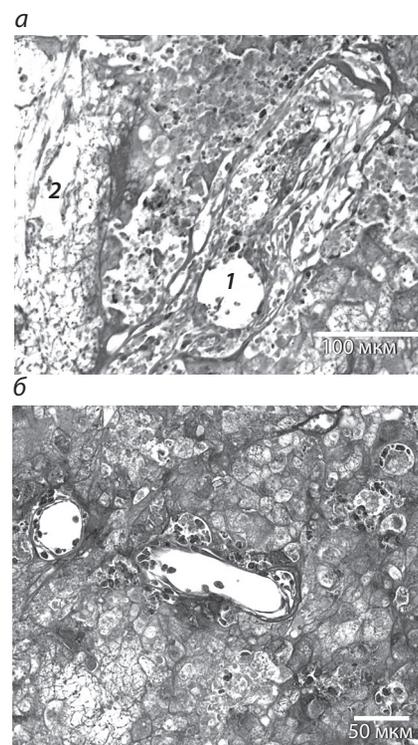


Рис. 5. Особенности деструкции опухолевой ткани ксенографтов карциномы A431.

а – кровеносный сосуд со слоистой стенкой: 1 – просвет сосуда, 2 – полость в детрите; б – выход лейкоцитов из кровеносного русла. Окраска по методу пикро-Маллори.

делеционного варианта Л-ИВП был введен репортерный ген зеленого флюоресцентного белка GFP2 (фенотип GFP⁺), который обеспечивал свечение инфицированных клеток под микроскопом «Axiovert» 40 CFL ZEISS с использованием люминесцентных светофильтров (*in vitro*) и в In-Vivo Multispectral Imaging System (Bruker) (*in vivo*).

Онколитическую активность вируса изучали на модели двух удаленных друг от друга ксенографтов эпидермоидной карциномы человека A431, трансплантированных подкожно мышам линии nude. Вирус вводили однократно интратуморально в один из ксенографтов, который моделировал первичный опухолевый узел. Второй ксенографт карциномы A431 моделировал метастаз.

Проведенные эксперименты показали, что при внутриопухолевом периферическом введении ТК-GFP⁺VGF⁻ вирус в первые же сутки, возможно, вследствие механического поврежде-

тканей, выходит в кровь и инфицирует удаленный опухолевый узел (метастаз), а также селезенку и легкие. На 4-е сут и далее на протяжении всего исследованного периода вирус в крови не регистрируется, что свидетельствует об отсутствии вторичной виремии. В этот же период вирус начинает регистрироваться в почках и печени, однако на 14-е сут после инфицирования ТК⁻GFP⁺VGF⁻ вирус выявляется только в опухоли и метастазе.

Рекомбинантный вирус VVdGF-GFP2 обладает высокой репродуктивной активностью в опухолевых клетках A431, которая в этом случае не отличается от таковой исходного штамма Л-ИВП (Kochneva et al., 2014). Важно, что этот вирус способен очень быстро, уже на 2-е сут после введения, достигать отдаленные от первичного места введения опухолевые узлы (метастазы), инфицировать их и локально реплицироваться в них до высоких концентраций (10⁹ БОЕ/мл на 8-е сут), разрушая при этом клетки опухоли, как следует из данных микроскопического анализа. Морфологических признаков репродукции вируса в клетках стромы ксенографтов не выявлено. Строгая внутриопухолевая локализация вируса подтверждается также анализом мышей в In-Vivo Multispectral Imaging System, в котором выявлено интенсивное свечение, индуцированное экспрессируемым в составе вируса GFP2, в районе опухоли и метастаза.

Полная деструкция ткани опухоли регистрировалась через 12 сут, а метастаза – через 20 сут после инъекции VVdGF-GFP2. В обоих случаях деструкция сопровождалась выраженным отеком и лейкоцитарной инфильтрацией ксенографтов. Рекомбинантный вирус индуцировал значимое уменьшение размеров опухоли и метастаза; к окончанию эксперимента (35-е сут) размер ксенографтов контрольных мышей в 10 раз превышал аналогичный параметр леченных (5 000 против 500 мм³).

Таким образом, на примере рекомбинантного штамма VVdGF-GFP2 и двух модельных ксенографтов карциномы человека A431, привитых мышам линии nude, мы показали, что аттенуированный ВОВ даже при однократном локальном введении не только способен адресно разрушать ткань первичного опухолевого узла, но также обладает отчетливым антиметастатическим действием, что подтверждает его высокую онколитическую активность.

Благодарности

Микроскопические исследования поддержаны грантом РФФИ № 13-04-01076 «Механизмы селективной репродукции вируса осповакцины в опухолевых клетках»; молекулярно-биологические работы по конструированию рекомбинантного вируса осповакцины финансированы Российским грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-4713.2014.4; все вирусологические работы, включая эксперименты с мышами линии nude проведены при поддержке Минобрнауки России (ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.», Соглашение № 14.604.21.0057 от 27.06.2014 г. (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0057).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Кочнева Г.В., Бабкина И.Н., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Юдин П.В., Сиволобова Г.Ф., Швалов А.Н., Попов Е.Г., Бабкин И.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. Апоптин усиливает онколитическую активность вируса осповакцины *in vitro*. Молекуляр. биология. 2013;47(5):842-852.
- Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Юдина К.В., Бабкин И.В., Чумаков П.М., Нетесов С.В. Онколитические поксвирусы. Молекуляр. генет., микробиол. и вирусология. 2012;1:8-15.
- Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М., 1998.
- Юнусова А.Ю., Зонов Е.В., Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И. Морфология ксенографтов карциномы A431 человека у мышей линии nude. Вестн. НГУ. 2014;12(3):42-48.
- Breitbart C., Arulanandam R., De Silva N., Thorne S., Thorne S., Daneshmand M., Moon A., Burke J., Hwang T. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res.* 2013;73(4):1265-1275.
- Breitbart C., Burke J., Jonker D., Stephenson J., Haas A., Chow L., Nieva J., Hwang T., Moon A., Thorne S., Pelusio A., LeBoeuf F., Burns J., Evgin L., De Silva N., Cvancic S., Robertson T., Je J., Lee Y., Parato K., Diallo J., Fenster A., Daneshmand M., Bell J., Kirn D. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature.* 2011;477:99-102.
- Breitbart C.J., Thorne S.H., Bell J.C., Kirn D.H. Targeted and armed oncolytic poxviruses for cancer: the lead example of JX-594. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012;3:1768-1772.
- Cochran M.A., Puckett C., Moss B. *In vitro* mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals. *J. Virol.* 1985;54(1):30-37.
- Haddad D., Chen N., Zhang Q., Chen C.-H., Yu Y.A., Gonzalez L., Aguilar J., Li P., Wong J., Szalay A.A., Fong Y. A novel genetically modified oncolytic vaccinia virus in experimental models is effective against a wide range of human cancers. *Ann. Surg. Oncol.* 2012;19:S665-S674.
- Kochneva G., Zonov E., Grazhdantseva A., Unusova A., Sivolobova G., Popov E., Taranov O., Netesov S., Chumakov P., Ryabchikova E. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression. *Oncotarget.* 2014;5(22):11269-11282.
- Kochneva G.V., Urmanov I.H., Ryabchikova E.I., Streltsov V.V., Serpinsky O.I. Fine mechanisms of ectromelia virus thymidine kinase-negative mutants avirulence. *Virus Res.* 1994;34:49-61.
- McCart A., Bartlett D., Moss B. Combined growth factor-deleted and thymidine kinase-deleted vaccinia virus vector. US Patent. 2007. N 7208313.
- Thorne S.H., Hwang T.H., O’Gorman B.E., Bartlett D.L., Sei S., Adiat F., Brown C., Werier J., Jo J.H., Lee D.E., Wang Y., Bell J., Kirn D.H. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest.* 2007;117:3350-3358.
- Weibel S., Raab V., Yu Y.A., Worschech A., Wang E., Marincola F.M., Szalay A.A. Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection. *BMC Cancer.* 2011;11:68-74.
- Yu Z., Li S., Brader P., Chen N., Yu Y.A., Zhang Q., Szalay A.A., Fong Y., Wong R.J. Oncolytic vaccinia therapy of squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer.* 2009;8:45-53.

Мышь линии SCID как модельное животное для оценки эффективности препаратов против натуральной оспы

К.А. Титова¹, Ал.А. Сергеев¹, А.С. Кабанов¹, Л.Е. Булычев¹, Ар.А. Сергеев¹, Д.О. Горбатовская¹, А.С. Замедянская¹, Л.Н. Шишкина¹, О.С. Таранов¹, В.В. Омигов¹, Е.Л. Завьялов², А.П. Агафонов¹, А.Н. Сергеев¹

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

При профилактике и лечении многих инфекционных заболеваний необходимо принимать во внимание ослабление иммунной системы пациентов. Поэтому возникает потребность в моделировании инфекций, в частности натуральной оспы, на иммунодефицитных организмах. Для решения данной задачи исследована возможность использования аутбредных мышей иммунодефицитной линии SCID в качестве модельного объекта. При интраназальном заражении вирусом натуральной оспы (ВНО) этих мышей в дозе $5,2 \log_{10}$ БОЕ (бляшкообразующая единица) не было обнаружено клинических признаков заболевания. При этом 50 %-я инфицирующая доза (ID_{50}) ВНО для животных, оцениваемая по регистрации наличия вируса в их легких через 4 сут после заражения, была равна $3,5 \log_{10}$ БОЕ и была относительно близка к таковой у человека, теоретически определенной путем выявления клинической картины заболевания. У мышей, интраназально зараженных дозой $5,2 \log_{10}$ БОЕ ($50 ID_{50}$) ВНО, было обнаружено размножение вируса только в органах респираторного тракта. Величины его концентраций в легких и носу напоминали таковые у больных людей и известных модельных животных (*Macaca cynomolgus* и мышь ICR), респираторно инфицированных близкими дозами ВНО. Причем существующие модельные животные значимо не отличались от мышей SCID по длительности присутствия вируса в легких. У мышей SCID, как и у человека и других модельных животных, были зарегистрированы сходные патоморфологические изменения в органах респираторного тракта воспалительно-некротического характера. Использование мышей SCID при оценке профилактической эффективности препаратов НИОХ-14 и ST-246 продемонстрировало адекватность полученных результатов таковым, описанным в научной литературе. Данное обстоятельство открывает перспективу применения мышей линии SCID в качестве экспериментальных объектов для моделирования натуральной оспы с целью разработки противовирусных препаратов, предназначенных для людей с выраженными иммунодепрессивными состояниями.

Ключевые слова: вирус натуральной оспы; мышь SCID; модельное животное; интраназальное инфицирование; 50 %-я инфицирующая доза; диссеминация вируса; патоморфологическое изменение; профилактическая эффективность.

Possibility of using a mouse SCID as a model animal to variola virus for evaluating anti-smallpox drug efficacy

K.A. Titova¹, Al.A. Sergeev¹, A.S. Kabanov¹, L.E. Bulychev¹, Ar.A. Sergeev¹, D.O. Galahova¹, A.S. Zamedyanskaya¹, L.N. Shishkina¹, O.S. Taranov¹, V.V. Omigov¹, E.L. Zavjalov², A.P. Agafonov¹, A.N. Sergeev¹

¹ Federal Budget Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk region, Koltsovo, Russia

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

At present, there is no animal model for smallpox that reflects the weakened immune system in people and can therefore help assess the prophylactic (highly preventive) efficiency of antiviral drugs. To fill in the gap, we have explored the possibility of using outbred immunodeficient SCID mice as a model animal for smallpox with the aid of virological, histological and electron microscopic and statistical methods. There was no clinical evidence of disease by intranasal infection of mice at a dose of $5,2 \log_{10}$ PFU (plaque forming units). At the same time, the 50 % infective dose (ID_{50}) of VARV estimated for animals by registering the presence of the virus in their lungs after 4 days post i.n. infection was $3,5 \log_{10}$ PFU and was relatively similar to that in humans, theoretically determined by identification of the clinical picture of the disease. Virus replication was detected only in the respiratory organs of mice, i.n. challenged with VARV at a dose of $5,2 \log_{10}$ PFU ($50 ID_{50}$). The values for its concentrations in the lungs and nose resembled those for affected people and well-known animal models (*Macaca cynomolgus* and ICR mice), respiratory infected with VARV at similar doses. The existing model animals were not significantly different from SCID mice in the duration of viral presence in the lungs. Moreover, in SCID mice, as in humans and other animal models, similar pathomorphological changes in the respiratory organs of inflammatory necrotic nature have been reported. Using SCID mice in assessing the prophylactic efficacy of the antiviral drugs NIOCH-14 and ST-246 demonstrated the adequacy of the results obtained to those described in the literature. This opens up



the prospect of using SCID mice as an animal model for smallpox to develop antiviral drugs intended for people with severe immunosuppressive states.

Key words: variola virus; SCID mouse; animal model; intranasal infection; 50 % infectious dose; dissemination of the virus; pathological damage; prophylactic efficacy.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Титова К.А., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Горбатовская Д.О., Замедьянская А.С., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Омигов В.В., Завьялов Е.Л., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Мышь линии SCID как модельное животное для оценки эффективности препаратов против натуральной оспы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):487-493. DOI 10.18699/VJ15.065

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Titova K.A., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Shishkina L.N., Taranov O.S., Omigov V.V., Zavjalov E.L., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Possibility of using a mouse SCID as a model animal to variola virus for evaluating anti-smallpox drug efficacy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):487-493. DOI 10.18699/VJ15.065

К настоящему времени подобрано два вида модельных для натуральной оспы животных – *M. cynomolgus* (Jahrling et al., 2004) и мышь аутбредной линии ICR (Сергеев и др., 2014) – с целью оценки эффективности противовирусных препаратов. Однако обезьяны являются крайне дорогостоящими и их применение в вирусологических экспериментах сопряжено с большой трудоемкостью. Результаты же оценки эффективности лечебно-профилактических препаратов против натуральной оспы в экспериментах на макаках циномогус и мышах популяции ICR применимы только для людей с нормально функционирующей иммунной системой. Некоторые существующие и разрабатываемые противооспенные препараты, например, из числа живых оспенных вакцин (Magennikova, Shchelkunov, 2005), могут создавать определенную угрозу для жизни человека, имеющего патологические изменения в органах, формирующих иммунитет, и проявлять при этом эффективность, отличающуюся от таковой у людей, не имеющих данной патологии. Причем с каждым годом число людей с подавленной функцией иммунной системы только растет.

С целью изучения активности противооспенных препаратов мы обратили внимание на поиск модельного животного для натуральной оспы из числа аутбредных линий мышей, с одной стороны, обладающих комбинированным иммунодефицитом, затрагивающим Т- и В-лимфоциты и иммуноглобулины, а с другой стороны, не имеющих изменений в клетках системы мононуклеарных фагоцитов (макрофагах), что крайне важно при проведении исследований с ортопоксвирусами (включая вирус натуральной оспы, ВНО), для которых основной клеткой-мишенью является макрофаг. Кроме того, аутбредные мыши в большей степени, чем инбредные, отражают действительное физиологическое состояние человеческой популяции, которая является далеко не инбредной (межсемейное, межнациональное и межрасовое скрещивание).

Целью настоящих исследований явилось изучение возможности использования мышей линии SCID, обладающих тяжелым комбинированным иммунодефицитом, в качестве модельных животных для натуральной оспы при оценке эффективности противооспенных препаратов.

Материалы и методы

Все эксперименты с живым ВНО были проведены в лаборатории с максимальным уровнем биологической защиты

(BSL-4) с использованием изолирующих пневмокостюмов на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Вирус. В экспериментах использовали штамм Ind-3a ВНО из Государственной коллекции вирусов и риккетсий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», приготовленный при культивировании на клетках Vero и имеющий биоконцентрацию $6,7 \pm 0,1 \log_{10}$ БОЕ/мл. Вирусосодержащий материал был расфасован в индивидуальные пробирки и хранился при температуре -70°C .

Клеточная культура. Для наработки вирусосодержащей суспензии и титрования различных биоматериалов использовали перевиваемую культуру клеток Vero, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Монослой клеток Vero выращивали в среде DMEM (ООО «БиолоГ», Россия) в присутствии 10 %-й эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США) с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). При культивировании вируса в качестве поддерживающей среды использовали ту же среду с антибиотиками, но с добавлением этой сыворотки (2 % по объему).

Животные. В исследованиях использовали разнополых 18–21-суточных мышей массой 12–14 г иммунодефицитной линии SCID Hairless Outbred SHO-PrkdcscidHrhr Mouse, полученных из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 & RFMEFI62114X0010), куда данная линия поступила из Charles River Laboratories в 2012 г. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях (National research Council, 2011). Исследования и манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» № 1-01.2014 от 28 января 2014 г.

Введение химических соединений при инфицировании мышей вирусом. В работе было использовано химическое соединение, синтезированное в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ранее проявившее противовирусную активность в отношении суррогатных ортопоксвирусов *in vitro* и *in vivo* – 7-[N'-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота (НИОХ-14) (Шишкина и др., 2015). В качестве положи-

тельного контроля использовали химическое соединение с установленной противоопухолевой активностью – 4-трифторметил-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[ф]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид (ST-246), синтезированное в НИОХ по описанной методике (Bailey et al, 2007). Все лабораторные образцы химических соединений были охарактеризованы и паспортизованы. Оба препарата имели сходный механизм противовирусного действия, который связан с блокированием процесса формирования оболочки вириона в инфицированных клетках, негативно влияя на образование патогенетически значимого экстрацеллюлярного оболочечного вируса. Ежедневно мышам SCID однократно перорально вводили по 0,2 мл суспензии этих соединений в дозе 60 мкг/г массы за 1 сут до заражения, через 2 ч, 1, 2 и 3 сут после заражения ВНО. В качестве плацебо вводили 0,2 мл раствора, содержащего 0,75 % метилцеллюлозы и 1 % Твина 80, использованного для приготовления суспензии препаратов НИОХ и ST-246.

Методы и дозы инфицирования мышей. Во всех экспериментах использовали мышей, которым интраназально вводили вирусосодержащую жидкость в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри. Причем перед проведением процедуры заражения животных наркотизировали с помощью изофлюранового наркоза.

При изучении клинической картины заболевания и динамики накопления вируса в легких мышей SCID (6 и 18 особей соответственно) интраназально заражали дозой $5,2 \log_{10}$ БОЕ ВНО. В экспериментах по оценке чувствительности мышей к возбудителю заболевания, основанных на выявлении наличия его в легких, животных инфицировали, используя по 6 особей на дозу вируса (1,2; 2,2; 3,2; 4,2; $5,2 \log_{10}$ БОЕ). Кроме того, ВНО вводили в одной дозе, равной $5,2$ или $4,5 \log_{10}$ БОЕ, при изучении динамики накопления патогена в органах, тканях и сыворотке крови животных (24 особи), патоморфологическом исследовании биоматериалов мышей (28 особей), изучении эффективности действия лекарственных препаратов. В последнем случае 27 животных делили на 3 группы.

Приготовление биоматериала подопытных мышей. Забор крови из ретроорбитального венозного синуса проводили у мышей, находящихся в состоянии эфирного наркоза. Забор же проб органов и тканей у экспериментальных животных осуществляли после проведения процедуры эвтаназии методом цервикальной дислокации. Для вирусологических исследований готовили 10 %-е (по объему) гомогенаты биоматериалов, взятых от инфицированных животных, путем их механической дезинтеграции с помощью пестика в ступке с речным песком и раствором Хенкса.

При изучении динамики накопления вируса в легких мышей было использовано по 3 особи на каждую временную точку (1, 2, 3, 4, 5 и 7-е сут после заражения), у которых брали легкие (от каждого по отдельности) с целью приготовления гомогенатов. При проведении исследований по определению чувствительности мышей к ВНО и оценке эффективности действия испытываемых препаратов осуществляли забор легких от каждого животного отдельно через 4 сут после заражения для приготовления гомогенатов. Для изучения динамики накопления

ВНО в органах, тканях и сыворотке крови мышей было взято по 4 особи на каждую временную точку (1, 2, 3, 4, 5, 7-е сут после заражения). У данных мышей из ретроорбитального венозного синуса осуществляли забор крови, из которой путем центрифугирования получали сыворотку и сгусток форменных элементов для последующего приготовления гомогената. Кроме того, от этих животных брали биоматериал (носовая перегородка со слизистой, головной мозг, трахея, легкие, пищевод, печень, селезенка, двенадцатиперстная кишка и почки). Органы и ткани, включая сгустки форменных элементов крови, каждый по отдельности от 4 животных, взятых на соответствующую временную точку, подвергали гомогенизации для последующего вирусологического исследования. Перед титрованием биоматериалы инфицированных мышей хранили при температуре -70°C . Для патоморфологического исследования забор органов и тканей (клетки крови, носовая перегородка со слизистой, головной мозг, трахея, бифуркационные лимфоузлы, легкие, печень, селезенка, поджелудочная железа, двенадцатиперстная кишка, брыжеечные лимфоузлы, почки, надпочечники, кусочки кожи) осуществляли через 1, 2, 3, 4, 5 и 7 сут после заражения, используя по 4 особи на каждую временную точку и контроль. При этом клетки крови получали ранее описанным способом.

Вирусологический анализ проб. Определение концентрации жизнеспособного вируса в используемой для заражения животных вирусосодержащей суспензии, гомогенатах органов и тканей, а также в сыворотке крови проводили традиционным методом титрования и подсчета количества бляшек в монослое клеток Vero, инфицированных разными разведениями исследуемого материала (Leparc-Goffart et al., 2005). Минимальное количество вируса, которое могло быть выявлено при использованном нами методе титрования, составляло $0,4 \log_{10}$ БОЕ/мл или БОЕ/легкие.

Патоморфологическое исследование. Для проведения световой и электронной микроскопии подготовку образцов органов животных, сами исследования и регистрацию результатов осуществляли так, как описано в ранее опубликованной работе (Sergeev et al., 2015a).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами (Закс, 1976) с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984–2001) с оценкой достоверности отличий ($p \leq 0,05$) для 95 %-го доверительного уровня (I_{95}). По формуле Спирмена–Кербера рассчитывали 50 %-ю инфицирующую дозу (ID_{50}). В экспериментах по оценке лечебно-профилактического действия препаратов сравнение доли инфицированных животных в группах проводили по критерию χ^2 , а для сравнения титров ВНО в легких мышей использовали U -критерий Манна–Уитни и t -критерий Стьюдента (Закс, 1976).

Результаты

В первой серии экспериментов, связанных с определением показателя чувствительности мышей SCID к ВНО, провели попытку выявления внешних клинических признаков заболевания у этих животных, интраназально инфицированных вирусом в дозе $5,2 \log_{10}$ БОЕ. При

Таблица 1. Динамика накопления штамма Ind-3a вируса натуральной оспы (ВНО) в биоматериалах^a от мышей линии SCID, интраназально инфицированных дозой 5,2 log₁₀ БОЕ (50 ИД₅₀)

Вид биоматериалов	Концентрация ВНО (log ₁₀ БОЕ/мл, M ± I ₉₅) в биоматериалах (n = 4) через разные промежутки времени (сут) после заражения					
	1	2	3	4	5	7
Клетки крови	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Сыворотка крови	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Головной мозг	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Носовая перегородка со слизистой	< 0,4	< 0,4	2,7 ± 0,4	2,2 ± 0,5	1,9 ± 0,3	< 0,4
Трахея	< 0,4	3,0 ± 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Легкие	3,3 ± 0,3	4,2 ± 0,3	3,9 ± 0,4	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,4	2,9 ± 0,3
Пищевод	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Печень	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Селезенка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Почки	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Двенадцатиперстная кишка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4

^a – органы и ткани в составе 10 %-х (по объему) гомогенатов, а также сыворотка крови; n – количество мышей, взятых на временную точку; M – среднее; I₉₅ – 95 %-й доверительный интервал; < 0,4 – величина ниже порога чувствительности (0,4 log₁₀ БОЕ/мл) использованного метода титрования.

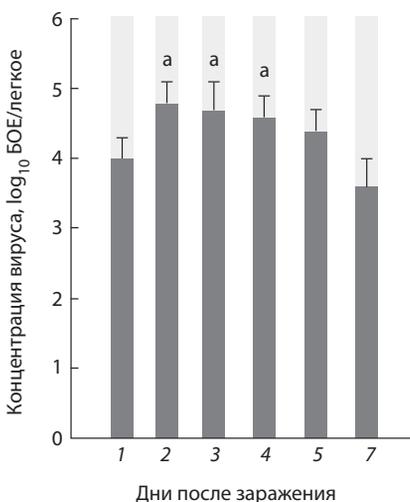


Рис. 1. Динамика накопления штамма Ind-3a вируса натуральной оспы в легких мышей линии SCID (n = 3, число животных на каждую временную точку), интраназально инфицированных дозой 5,2 log₁₀ БОЕ (50 ИД₅₀). Средние значения концентраций приведены на логарифмической шкале. a – величина концентрации вируса выше, чем таковая через 1 сут после заражения, p < 0,05.

этом не было зарегистрировано какой-либо симптоматики у мышей в процессе наблюдений в течение 21 сут после заражения. Для выяснения возможности существования бессимптомного течения заболевания у этих животных было проведено изучение динамики накопления патогена

у мышей, интраназально зараженных дозой 5,2 log₁₀ БОЕ, в основном органе входных ворот для натуральной оспы – легких (рис. 1). При этом был отмечен существенный рост величин концентрации вируса в этом органе через 2–4 сут после заражения по сравнению с таковой через 1 сут после заражения.

На следующем этапе с использованием результатов предыдущих исследований был проведен эксперимент на мышах, интраназально инфицированных разными дозами ВНО, по оценке ИД₅₀, рассчитанной с учетом фиксации данных о наличии вируса в легких через 4 сут после заражения. При этом было определено, что значение этого показателя – 3,5 ± 0,7 log₁₀ БОЕ.

Затем было проведено изучение динамики диссеминации ВНО в органах, тканях и сыворотке крови мышей через 1, 2, 3, 4, 5 и 7 сут после интраназального инфицирования дозой 5,2 log₁₀ БОЕ (50 ИД₅₀ для этого вида животных). Результаты этих экспериментов представлены в табл. 1.

Из данных таблицы видно, что уже через 1 сут после заражения возбудитель заболевания был обнаружен только в легких мышей SCID, затем через 2 сут патоген в относительно высоких концентрациях был зарегистрирован в легких и трахее, а через 3 сут вирус появился и в носу (носовой перегородке со слизистой), но не детектировался в трахее. В течение 3 сут (с 3-х по 5-е сут после заражения) ВНО продолжал регистрироваться только в легких и носу (носовой перегородке со слизистой), перестав выявляться в последнем органе через 7 сут после заражения, тогда как в легких он определялся в это время в низкой концентрации по сравнению с таковой через 2–5 сут после заражения. При этом во все сроки исследования от 1 до 7 сут после заражения вирус вообще не был обнаружен с помощью использованного метода титрования в других исследованных биоматериалах (клетки крови, сыворотка крови, головной мозг, пищевод, печень, селезенка, почки, двенадцатиперстная кишка). Самые высокие значения концентраций ВНО из трех продуцирующих вирус органов имели легкие через 2–5 сут после заражения, когда их величины находились в диапазоне от 3,7 до 4,2 log₁₀ БОЕ/мл.

При проведении гистологических и электронно-микроскопических исследований мышей, интраназально инфицированных ВНО в дозе 5,2 log₁₀ БОЕ (50 ИД₅₀), было отмечено, что патоморфологические изменения у этих животных были ограничены органами респираторного тракта (воспалительные и деструктивные очаги в легких, трахее и слизистой носовой полости) (рис. 2).

В следующей серии экспериментов проводили оценку эффективности профилактического действия препаратов на мышах, наблюдая за величинами

концентраций ВНО в легких животных через 4 сут после интраназального заражения дозой $4,5 \log_{10}$ БОЕ (10 ИД_{50}). Результаты этих исследований представлены в табл. 2.

Из данных таблицы видно, что количество обработанных препаратом НИОХ-14 мышей SCID с зарегистрированным содержанием ВНО в легких через 4 сут после заражения достоверно ниже, чем в контроле (при $p \leq 0,05$), чего нельзя сказать в отношении препарата ST-246. В то же время оба используемых препарата по сравнению с контролем вызывали эффект значимого снижения средних концентраций вируса в легких мышей через 4 сут после заражения. При этом введение НИОХ-14 и ST-246 в одинаковых дозах не выявило существенных различий между этими препаратами по эффективности противооспенного действия.

Обсуждение

При оценке показателей чувствительности мышей к ВНО при интраназальном и внутрибрюшинном способах инфицирования большинство исследователей (Murti, Shrivastav, 1957; Maug, Herrlich, 1960; Капцова, 1967) ориентировалось в основном на выявлении у них клинических признаков заболевания, включая летальный эффект, отмечая при этом относительно низкую восприимчивость животных к вирусу, тогда как наши исследования были направлены на регистрацию не только внешних признаков заболевания, но и инфекционного процесса (по наличию вируса в первичных органах-мишенях), что существенно снизило порог чувствительности метода оценки показателя восприимчивости этих животных к вирусу за счет появившейся возможности регистрировать бессимптомное течение заболевания. Это позволило нам получить величину данного показателя для мышей SCID к ВНО ($\text{ИД}_{50} = 3,5 \pm 0,7 \log_{10}$ БОЕ), оцененную по развитию у них инфекционного процесса в легких. Причем данная величина достоверно не отличалась от таковой одного известного модельного животного (мышей ICR), но оказалась в $10\text{--}10^6$ раз ниже, чем значения ИД_{50} , полученные для другого животного (*M. cynomolgus*), и в $10^6\text{--}10^7$ раз ниже, чем величина

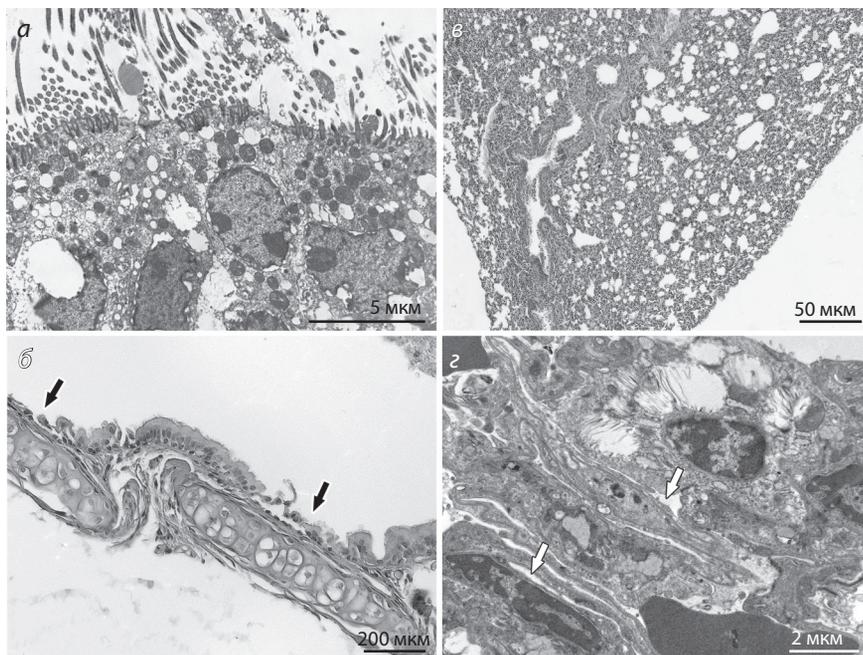


Рис. 2. Световая и электронная микроскопия респираторных органов мышей иммунодефицитной линии SCID после заражения интраназальным способом штаммом Ind-3a вируса натуральной оспы (ВНО) в дозе $5,2 \log_{10}$ БОЕ.

a – электронограмма слизистой носа мыши через 4 сут после заражения: дистрофические изменения эпителия слизистой оболочки – утрата ресничек, вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов; *б* – гистогарма слизистой трахеи мыши через 3 сут после заражения: эпителиальный слой частично утрачен (стрелки); *в* – гистогарма ткани легкого мыши через 5 сут после заражения: резко выраженная воспалительная инфильтрация паренхимы с преобладанием ателектазов и интенсивный периваскулярный отек; *z* – электронограмма ткани легкого мыши через 5 сут после заражения: ателектазы, стрелками указаны спавшиеся просветы альвеол.

дозы реально используемой для заражения этих приматов ВНО при оценке эффективности разрабатываемых противооспенных препаратов (Huggins et al., 2009; Mucker et al., 2013; Сергеев и др., 2014).

Сам факт размножения вируса в органах дыхательной системы мышей SCID после респираторного заражения ВНО в определенной степени согласуется с таковым у человека и известных модельных животных (Hahon, Wilson, 1960; Sarkar et al., 1973; Jahrling et al., 2004; Сергеев и др., 2014). При этом исследователи (аналогично нашим данным для носовой перегородки со слизистой, табл. 1) обнаруживали максимальные концентрации вируса в глоточных смывах людей ($3\text{--}5 \log_{10}$ ООЕ/мл) и *M. cynomolgus* ($2,0\text{--}4,5 \log_{10}$ БОЕ/мл) (Sarkar et al., 1973; Jahrling et al., 2004), а также в гомогенатах ноздрей и носоглотки *M. cynomolgus* и мышей ICR ($2,0\text{--}4,8 \log_{10}$ ООЕ/мл) (Hahon, Wilson, 1960; Сергеев и др., 2014). Однако длительность присутствия вируса в верхнем отделе респираторного тракта у приматов и человека (Hahon, Wilson, 1960; Marennikova, Shchelkunov, 2005) была существенно больше (≥ 11 сут), чем у интраназально инфицированных мышей SCID (3 сут). Титры вируса в легких модельных животных (*M. cynomolgus* и мышь ICR) при респираторном заражении дозами $4,7 \log_{10}$ ООЕ и $4,2 \log_{10}$ БОЕ, соответственно, имели значения $3,8\text{--}5,5 \log_{10}$ ООЕ/мл (Hahon, Wilson, 1960; Сергеев и др., 2014), близкие таковым, полученным нами на мышах SCID, интраназально зараженных сходной дозой ВНО ($5,2 \log_{10}$ БОЕ). По длительности инфекционного процесса в легких приматов и мышей (8–11 сут) существенных различий не было.

Проведенный сравнительный анализ данных литературы относительно патоморфологических изменений у человека и модельных животных (*M. cynomolgus* и мышь ICR) после заражения ВНО через респираторный тракт (Cann et al., 2013; Сергеев и др., 2014) и результатов наших исследований на интраназально инфицированных мышах SCID свидетельствовал об их

Таблица 2. Профилактическая активность препаратов у интраназально инфицированных мышей линии SCID штаммом Ind-3a вируса натуральной оспы, доза 4,5 log₁₀ БОЕ (10 ИД₅₀)

Показатель	Препараты, ежедневно вводимые перорально однократно за 1 сут до, в день и в течение 3 сут после заражения		
	НИОХ-14	ST-246	контроль
Суточная доза вводимого препарата, мкг/г	50	50	a
Кол-во животных, взятых в эксперимент	10	9	8
Концентрация ВНО в легких (в log ₁₀ БОЕ/легкие, M ± I ₉₅) у каждой мыши через 4 сут после интраназального инфицирования	2,1 ± 2,2	2,4 ± 0,1	3,2 ± 0,8
	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,9 ± 0,9
	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,6 ± 0,0
	2,2 ± 0,6	2,1 ± 0,4	3,1 ± 0,3
	2,7 ± 0,7	2,1 ± 0,2	3,6 ± 0,1
	< 0,4	2,3 ± 0,5	3,0 ± 0,0
	< 0,4	2,3 ± 0,4	3,3 ± 0,4
	< 0,4	< 0,4	3,3 ± 0,9
	< 0,4	< 0,4	
	< 0,4		
Средняя концентрация вируса в легких мышей через 4 сут после заражения, log ₁₀ БОЕ/легкое (M ± I ₉₅)	2,1 ± 0,6 ^b (n = 5)	2,3 ± 0,1 ^b (n = 7)	3,3 ± 0,2 (n = 8)
Индекс подавления накопления вируса ^c , log ₁₀ БОЕ/легкое	1,2	1,0	–
Кол-во (%) инфицированных мышей через 4 сут после заражения	5 (50) ^d	7 (78)	8 (100)
% защиты от инфицирования ^e	50	22	–

n – число животных; M – среднее; I₉₅ – 95 %-й доверительный интервал; ^a – мышам контрольной группы вводили раствор метилцеллюлозы с Твином 80, который использовали для приготовления суспензии препаратов НИОХ-14 и ST-246; < 0,4 – величина ниже порога чувствительности (0,4 log₁₀ БОЕ/легкие) использованного метода титрования; ^b – достоверное отличие от контроля (двусторонний t-тест Стьюдента с одинаковыми дисперсиями); ^c – величина, равная разности между log₁₀ концентрации вируса в легких мышей в контроле и log₁₀ концентрации вируса в легких мышей в опыте; ^d – достоверное отличие от контроля (точный тест Фишера p одностороннее < 0,05); ^e – величина, равная разнице между % инфицированных мышей в контроле и % инфицированных мышей в опыте; «–» – величина не определяется.

большом сходстве: имелись поражения органов дыхания, носящие воспалительно-деструктивный характер. При этом ранее в экспериментах *in vitro* с использованием клеток системы мононуклеарных фагоцитов (селезеночных моноцитов-макрофагов), полученных от мышей ICR, вирусологическим и электронно-микроскопическим методами были выявлены признаки размножения ВНО в этих клетках (Сергеев и др., 2014). Результаты данных экспериментов вполне можно экстраполировать на мышей SCID, учитывая то обстоятельство, что тяжелый комбинированный иммунодефицит, созданный у мышей этой линии, затронул только Т- и В-клеточное звено и не привел к каким-либо изменениям в других клетках организма, в том числе системы мононуклеарных фагоцитов (Belizáio, 2009). С помощью вирусологического метода (при титровании гомогенатов трахеи и носовой перегородки со слизистой) у интраназально зараженных мышей SCID на начальном этапе (через 2-е и 3-е сут после заражения) было обнаружено накопление ВНО (табл. 2), что в совокупности с данными по воспалительно-деструктивным изменениям именно слизистой респираторного тракта этих животных свидетельствовало о вовлечении в инфекционный процесс эпителиоцитов. В научной литературе также отмечен факт размножения

ВНО в макрофагах и эпителиоцитах респираторных органов у модельных для натуральной оспы животных при аэрозольном, интраназальном и внутривенном заражении (Hahon, Wilson, 1960; Jahrling et al., 2004; Wahl-Jensen et al., 2011; Сергеев и др., 2014).

В отличие от человека и модельного животного (*M. cynomolgus*), у которых при респираторном заражении наблюдалось генерализованное течение заболевания с соответствующей симптоматикой, у мышей SCID инфекционный процесс протекал бессимптомно (так же, как и у мышей ICR) и ограничивался первичными респираторными органами. Данное обстоятельство исключает возможность использования этих животных для оценки терапевтической эффективности разрабатываемых противооспенных препаратов, но сохраняет возможность их применения для изучения профилактической (экстренно-профилактической) активности. Это обусловлено тем, что профилактическое (экстренно-профилактической) введение препаратов ориентировано на борьбу с вирусом именно в первичных органах-мишенях, которые при натуральной оспе располагаются в респираторном тракте.

При изучении профилактической активности известных противооспенных препаратов ST-246 и НИОХ-14 на мышях SCID с применением ВНО подтверждено наличие

ранее отмеченного нами и многими исследователями (эксперименты с использованием различных видов ортопоксвирусов, культур клеток и соответствующих известных модельных животных) (Smith et al., 2009; Sergeev et al., 2015a, b) противовирусного эффекта, что свидетельствует об адекватности использования нами для этой цели аутобредных иммунодефицитных мышей SCID.

Таким образом, несмотря на то что мыши SCID при респираторном инфицировании ВНО не воспроизводили клиническую картину осподобного заболевания, они обладали относительно близкой к человеку чувствительностью к данному вирусу (по результатам регистрации наличия вируса в легких) и моделировали первое звено инфекционного процесса при натуральной оспе у людей (или модельных животных – макаки циномогус и мыши ICR), включая размножение вируса в органах респираторного тракта, патоморфологические изменения в них и типы первичных клеток-мишеней, а также адекватно демонстрировали при интраназальном заражении ВНО наличие противовирусного эффекта у исследуемых препаратов. Все это делает возможным реальное использование данных животных в экспериментах с ВНО для оценки профилактического (экстренно-профилактического) действия разрабатываемых противооспенных препаратов для людей с подавленной иммунной системой. Изучение же лечебной (терапевтической) и профилактической (экстренно-профилактической) активности лекарственных средств против натуральной оспы может быть проведено с использованием ВНО на ранее известных иммунокомпетентных моделях (*M. cynomolgus* и мышь ICR соответственно).

Благодарности

Данная научная работа проведена при финансовой поддержке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и Роспотребнадзора в рамках Государственного задания по теме № 03-5-14.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Закс Л. Статистическое оценивание. М., 1976.
- Капцова Т.И. Разработка экспериментальных моделей натуральной оспы. Дис. канд. мед. наук. М., 1967.
- Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ал.А., Таранов О.С., Титова К.А., Пьянков О.В. Замедянская А.С., Горбатовская Д.О., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Шишкина Л.Н. Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы. Патент РФ № 2522483. Бюл. № 20 от 20.07.14.
- Шишкина Л.Н., Сергеев А.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Горбатовская Д.О., Пьянков О.В., Борматов Н.И., Щукин Г.И., Селиванов Б.А., Тихонов А.Я. Лечебно-профилактическое средство против вируса натуральной оспы и способы его получения и применения. Патент РФ № 2543338. Бюл. № 6 от 27.02.15.
- Bailey T.R., Rippin S.R., Opsitnick E., Burns C.J., Pevear D.C., Collett M.S., Rhodes G., Tohan S., Huggins J.W., Baker R.O., Kern E.R., Keith K.A., Dai D., Yang G., Hruby D., Jordan R. N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-Octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[*f*]isoindol-2-(1*H*)-yl)carboxamides: identification of novel orthopoxvirus egress inhibitors. *J. Med. Chem.* 2007;50(7):1442-1444.
- Belizário J.E. Immunodeficient mouse models: An overview. *Open Immunol. J.* 2009;2:79-85.
- Cann J.A., Jahrling P.B., Hensley L.E., Wahl-Jensen V. Comparative pathology of smallpox and monkeypox in man and macaques. *J. Comp. Path.* 2013;148:6-21.
- Hahon N., Wilson B.J. Pathogenesis of variola in *Macaca irus* monkeys. *Amer. J. Hyg.* 1960;71:69-80.
- Huggins J., Goff A., Hensley L., Mucker E., Shamblin J., Wlazlowski C., Johnson W., Chapman J., Larsen T., Twenhafel N., Karem K., Damon I.K., Byrd C.M., Bolken T.C., Jordan R., Hruby D. Non-human primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(6):2620-2625.
- Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J., LeDuc J.W., Rubins K.H., Relman D.A., Huggins J.W. Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101(Iss. 42):15197-15200.
- Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.-H., Fuchs F., Crançe J.-M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J. Clin. Virol.* 2005; 32:47-52.
- Marennikova S.S., Shchelkunov S.N. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. Springer: N.Y., USA, 2005.
- Mayr A., Herrlich A. Zuchtung des Variolavirus in der infantilen Maus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 1960;10(2):226-235.
- Mucker E.M., Goff A.J., Shamblin J.D., Grosenbach D.W., Damon I.K., Mehal J.M., Holman R.C., Carroll D., Gallardo N., Olson V.A., Clemmons C.J., Hudson P., Hruby D.E. Efficacy of Tecovirimat (ST-246) in nonhuman primates infected with variola virus (smallpox). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(Iss. 12):6246-6253.
- Murti B.R., Shrivastav J.B. A study biological behavior of variola virus. II. Experimental inoculation of laboratory animals. *Indian J. Med. Sci.* 1957;11(Iss. 8):580-587.
- National research Council: Guidelines on laboratory animal care and use, 8th ed. National research Council of the National Academies, Washington: The National Academies Press, 2011.
- Sarkar J.K., Mitra A.C., Mukherjee M.K., De S.K., Guha Mazumdar D. Virus excretion in smallpox. I. Excretion in the throat, urine and conjunctive of patients. *Bull. WHO.* 1973;48:517-522.
- Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Pyankov O.V., Bodnev S.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Glotova A.G., Taranov O.S., Omigov V.V., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. The possibility of using the ICR mouse as an animal model to assess anti-monkeypox drug efficacy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015a; DOI: 10.1111/tbed.12323
- Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Pyankov O.V., Bodnev S.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Glotova T.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Using the ground squirrel (*Marmota bobak*) as an animal model to assess monkeypox drug efficacy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015b; DOI: 10.1111/tbed.12364
- Smith S.K., Olson V.A., Karem K.L., Jordan R., Hruby D.E., Damon I.K. *In vitro* efficacy of ST246 against smallpox and monkeypox. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53:1007-1012.
- Wahl-Jensen V., Cann J.A., Rubins K.H., Huggins J.W., Fisher R.W., Johnson A.J., de Kok-Mercado F., Larsen T., Raymond J.L., Hensley L.E., Jahrling P.B. Progression of pathogenic events in cynomolgus macaques infected with variola virus. *PLoS One.* 2011;6: e24832.

Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей

Е.А. Литвинова¹, М.Д. Беляев¹, А.В. Прохорчук², В.С. Коростина², Е.Б. Прохорчук², Е.Н. Кожевникова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Нарушение синтеза основного протеогликана кишечника (муцин-2) у людей характерно как при развитии неспецифического язвенного колита, так и при болезни Крона. Такие морфологические изменения кишечного слизистого слоя могут повлиять на разнообразие кишечной микрофлоры. Использование антибиотиков для лечения бактериальных инфекций у людей и животных с нарушением синтеза муцина-2 может быть малоэффективным, а иногда и опасным из-за развития сепсиса или хронического воспаления. В работе на мышах с генетически детерминированным дефицитом муцина-2 (линия *Muc2*^{-/-}) исследовали как применение трех антибиотиков (кларитромицин, амоксицилин и метронидазол) влияет на элиминацию патогенной инфекции у мышей. Для оценки эффективности антибиотиков измеряли количество патогенных (*Helicobacter* spp.) и симбиотических (*E. coli*) бактерий в кишечнике животных. Негативное влияние антибактериальной терапии на организм хозяина оценивали по выживаемости животных. Три антибиотика не способствовали устранению *Helicobacter* spp. у мышей с дефицитом муцина-2. Наряду с неэффективным лечением была отмечена гибель у 60 % животных данной линии. Мыши с нормальной функцией синтеза муцина-2 (C57BL/6J) имели 100 %-е выживание. Животные с нормальной функцией синтеза основного кишечного протеогликана не демонстрировали снижения массы тела. *Helicobacter* spp. был полностью устранен у этих животных. Таким образом, лечение инфекции *Helicobacter* spp. антибиотиками у животных с нарушением синтеза муцина-2 не только малоэффективно, но и вызывает гибель животного. Высокая восприимчивость к токсическому действию антибиотиков дает основание для использования мышей с дефицитом муцина-2 в качестве тест-объекта для оценки фармакологической безопасности новых средств антибактериальной терапии.

Ключевые слова: мыши; кишечное воспаление; муцин-2; антибактериальная терапия.

Role of intestinal mucin-2 in the effectiveness of the treatment of *Helicobacter* spp. infection in laboratory mice

E.A. Litvinova¹, M.D. Belyaev¹, A.V. Prokhortchouk², V.S. Korostina², E.B. Prokhortchouk², E.N. Kozhevnikova¹

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

² Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abnormal synthesis of the main intestinal proteoglycan mucin-2 is typical of ulcerative colitis and Crohn's disease in humans. Those morphological changes of the mucus layer affect the diversity of the intestinal microflora. Antibiotics may be ineffective or even dangerous to humans or animals deficient for mucin-2 because of the risk of sepsis and chronic inflammation. In this study, we investigated the potential of antibiotics (clarithromycin, amoxicillin, and metronidazole) in elimination of pathogenic infection from *Muc2* knockout mice (*Muc2*^{-/-}). We assayed the population sizes of pathogens (*Helicobacter* spp.) and symbiotic (*E. coli*) bacteria in the intestines of animals as a criterion of antibiotic efficacy. The damaging effect of antibacterial treatment on the host body was estimated from their survival rate. Three antibiotics were ineffective in the elimination of *Helicobacter* spp. from mucin-2-deficient mice. Moreover, the mortality of *Muc2* knockout mice during the antibacterial treatment was 60 %. The survival of wild-type mice (C57BL/6J) during the treatment was 100 %. The weight of wild-type mice showed no decrease during the treatment. The *Helicobacter* spp. pathogen was fully eradicated from wild-type mice. Thus, therapy of *Helicobacter* spp. infection in mucin-2 deficient animals is not only poorly efficient but even deadly. The high susceptibility to antibiotics allows *Muc2* knockout mice to be used as a test model to evaluate the pharmacological safety of new antibiotics.

Key words: mice; intestinal inflammation; mucin-2; antibacterial treatment.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Литвинова Е.А., Беляев М.Д., Прохорчук А.В., Коростина В.С., Прохорчук Е.Б., Кожевникова Е.Н. Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):494-498. DOI 10.18699/VJ15.066

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Litvinova E.A., Belyaev M.D., Prokhortchouk A.V., Korostina V.S., Prokhortchouk E.B., Kozhevnikova E.N. Role of intestinal mucin-2 in the effectiveness of the treatment of *Helicobacter* spp. infection in laboratory mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):494-498. DOI 10.18699/VJ15.066

DOI 10.18699/VJ15.066

УДК 57.023

Поступила в редакцию 03.07.2015 г.

Принята к публикации 21.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

✉ e-mail: litvinova@bionet.nsc.ru; kozhevnikova@bionet.nsc.ru

Экспериментальные модели воспалительных заболеваний кишечника (inflammatory bowel disease – IBD) на лабораторных животных активно используют для понимания процессов неспецифического язвенного колита и болезни Крона у людей (O'Connor, 2011). Существуют три типа экспериментальных моделей воспалительных заболеваний кишечника на животных: 1) модель химически индуцированного воспаления кишечника; 2) модель пересадки иммунных тканей животных с воспаленным кишечником иммунодефицитным животным; 3) генетические модели животных с предрасположенностью к воспалению кишечника. Признаком всех моделей воспалительных заболеваний кишечника является истончение протеогликанового слоя кишечника, образующего первый защитный барьер на пути бактерий (Hansson, Johansson, 2010). Благодаря новым молекулярно-генетическим подходам можно создавать животных с мутациями генов кишечного барьера, в частности с нокаутом гена кишечного муцина-2 (*Muc2*^{-/-}). Муцин-2 является основным протеогликаном кишечника, и его дефицит приводит к воспалениям (Martens et al., 2009; Bergstrom et al., 2010; Morgan et al., 2012).

Воспалительные процессы в кишечнике всегда ассоциированы с бактериальными инфекциями. Одним из распространенных специфических патогенов лабораторных мышей, который вызывает воспаления в кишечнике, является *Helicobacter hepaticus* (Chin et al., 2000). Основным способом лечения бактериальных инфекций как у людей, так и у животных являются антибиотики широкого спектра действия. Их применение приводит к изменению состава симбиотической микрофлоры кишечника (дисбактериозу), развитию воспалительных процессов и уменьшению толщины слоя кишечного протеогликана (Rakoff-Nahoum, Medzhitov, 2007; Ubeda et al., 2010; Wlodarska et al., 2011). Лечение антибиотиками животных с экспериментальной моделью химически индуцированного воспаления кишечника вызывает гибель животного от сепсиса (Ayres et al., 2012).

Таким образом, развитие воспалительных процессов в кишечнике может, с одной стороны, увеличивать чувствительность к различным кишечным инфекциям, с другой – негативно влиять на эффективность их лечения. В связи с этим целью нашей работы было выяснить степень заражения *Helicobacter* spp. и эффективность лечения инфекции антибиотиками у животных с генетически детерминированным дефицитом муцина-2. Мы использовали мышей с двойным нокаутом генов *Muc2*^{-/-} и *Kaiso*^{-/-} (университет Эдинбурга на генетическом фоне C57BL/6). Для выявления собственных эффектов дефицита транскрипционного фактора *Kaiso* была также исследована линия мышей с нокаутом только этого гена (Prokhortchouk et al., 2006).

Материалы и методы

Исследование выполнено в Центре генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на мышах самцах и самках *Kaiso*^{-/-} и *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-} на генетическом фоне C57BL/6J в возрасте 12–16 нед. Референтной группой служили мыши линии C57BL/6J. Животные, зараженные *Helicobacter hepaticus*,

поступили в наш центр в 2012 г. из питомника «Пушино». Мышей с мутациями *Kaiso*^{-/-} и *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-} на генетическом фоне C57BL/6J создали в университете Эдинбурга и передали лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных (Институт биоинженерии, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва). Животных содержали однопольными группами по 4–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (Optimise, США) при искусственном световом режиме 14С : 10Т, температуре 20–22 °С, влажности 36 % и давлении 38 Па. В качестве подстилки использовали обеспыленную березовую стружку. Животным *ad libitum* предоставляли стерильную деионизированную воду с добавлением минералов K⁺Mg²⁺ («Северянка», г. Санкт-Петербург) и корм ssniff® R/M-H autoclavable V1534-3 (Ssniff, Германия). Работу с животными проводили по биоэтическим нормам Директивы Евросоюза (ECC Directive 86/609/EEC).

Согласно международным требованиям к содержанию животных SPF-статуса, проводили мониторинг патогенов по списку, рекомендованному FELASA (Nicklas et al., 2002). У животных не было следующих видоспецифических бактериальных и вирусных инфекций: Mouse hepatitis virus, Mouse rotavirus (EDIM), Minute virus of mice, Mouse parvovirus, Pneumonia virus of mice, Sendai virus, Theiler's murine encephalomyelitis virus, Ectromelia virus, Lymphocytic choriomeningitis virus, Mouse adenovirus type 1 (FL), Mouse adenovirus type 2 (K87), Mouse cytomegalovirus, Reovirus type 3, *Citrobacter rodentium*, *Clostridium piliforme* (Tyzzer's disease), *Corynebacterium kutscheri*, *Mycoplasma* spp., *Pasteurellaceae*, *Salmonella* spp., *Streptococci b-haemolytic* (not group D), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptobacillus moniliformis* (Nicklas et al., 2010).

Оценку количества ДНК патогенной бактерии *Helicobacter* spp. и симбиотической бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*) проводили в образцах фекалий, собранных в стерильных условиях методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени во всех экспериментальных группах до и через неделю после лечения антибиотиками.

Выделение ДНК из фекалий (200–500 мкг) выполняли следующим способом: образец гомогенизировали инкубированием 10 мин при температуре 65 °С в 500 мкл буфера 50 мМ трис(гидроксиэтил)аминометана (Трис)-HCl 0,1 % Твин-20 20 мМ ЭДТА с лизоцимом 100 мкг/мл, разбивали на шейкере и центрифугировали 5 мин при 10 000 об./мин. 100 мкл супернатанта переносили в чистую пробирку и лизировали 500 мкл буфера 4 М гуанидин гидрохлорида 50 мМ Трис-HCl 20 мМ ЭДТА 1,3 % Твин-20. Образец перемешивали и инкубировали 10 мин при температуре 65 °С. К образцу добавляли 250 мкл 96 % этилового спирта и 30 мкл взвеси SiO₂ в 50 мМ-ном растворе Трис-HCl и перемешивали 5 мин. Образец центрифугировали (3 000 об./мин, 5 мин) и удаляли супернатант. Осадок промывали последовательно 500 мкл промывочного буфера 4 М гуанидин гидрохлорида 50 мМ Трис-HCl 25 %-го этилового спирта и 500 мкл 70 %-го этилового спирта. Осадок высушивали, ДНК растворяли в 100 мкл воды. Образец центрифугировали (10 000 об./мин, 5 мин), отбирали супернатант в чистую пробирку и определяли концентрацию ДНК в пробе при

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для метода количественного определения ДНК в полимеразной цепной реакции

Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'
Mus-F	CCTGGCGCTAAACCATTCTGT
Mus-R	AAAGCCCGCAGAGACAAACC
Hel.spp-F	CGGAGGGTGCAAGCGTTACT
Hel.spp-R	ATCCACCTGCCTCTCCAC
E.coli-F	GGCAGGCCTAACACATGCAAC
E.coli-R	CCCCTCTTTGGTCTTGCAGC

F – прямой праймер, R – обратный праймер.

помощи УФ-спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Количество бактерий в кишечнике оценивали по количеству бактериальной ДНК, нормированному на ДНК, которая кодирует 28S рРНК *Mus musculus* в фекалиях. Для определения *Helicobacter* spp. и *E. coli* использовали праймерные олигонуклеотиды, комплементарные участку гена 16S рРНК этой группы бактерий (табл. 1). Количество ДНК *Mus musculus* определяли с помощью олигонуклеотидных праймеров к участку гена 28S рРНК мыши (табл. 1). Все праймерные последовательности подбирали при помощи базы данных BLAST и программы Mipgro UGENE. В реакционную смесь, содержащую Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, США) и соответствующие 0,5 мкМ праймерные олигонуклеотиды, добавляли 25 нг ДНК, выделенной из фекалий (объем реакции 25 мкл). Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). ДНК денатурировали 5 мин при 95 °С, затем проводили 45 циклов: денатурация – 95 °С 15 с, отжиг праймерных олигонуклеотидов – 62 °С 25 с, синтез – 62 °С 25 с.

Нормирование бактериальной ДНК на ДНК мыши (*M. musculus*) выполняли по формуле: $2^{-(N \text{ цикла } M. \text{ musculus}) - (N \text{ цикла бактерии})}$, где номер цикла (N цикла) соответствует середине экспоненциальной фазы ПЦР реакции, которую для всех проб устанавливали на 500 ед. флуоресцентной эмиссии.

Влияние антибактериальной терапии на элиминацию *Helicobacter* spp. исследовали на группах мышей всех генотипов, в состав которых входило по 5 самок и самцов. Для этого в корм добавляли 3 антибиотика: метронидозол (1 мг в 5 г корма для лабораторных животных), амоксицилин (3 мг в 5 г корма), кларитромицин (0,5 мг в 5 г корма). Ежедневно в течение 2 нед давали 5 г корма с антибиотиками, что соответствует суточной потребности одного животного. Данную схему антибактериальной терапии использовали для получения 100 %-й эффективной элиминации *Helicobacter hepaticus* у иммунодефицитных линий мышей (Kerton, Warden, 2006). В корм также добавляли антибактериальный препарат оксид висмута (Де-Нол) и вспомогательное средство, угнетающее секрецию желудочной кислоты (Омепрозол). В 5 г корма добавляли

соответственно 0,185 мг Де-Нола и 0,02 мг Омепрозола.

У всех мышей в течение курса лечения каждые два дня определяли массу тела, оценивали общее состояние по внешнему виду и отмечали состояние фекальных масс.

Статистическую обработку производили при помощи пакета программного обеспечения STATISTICA6.1. Для выборок логарифма $2^{-(N \text{ цикла } M. \text{ musculus}) - (N \text{ цикла бактерии до лечения антибиотиками})}$ и изменения массы тела с нормальным распределением использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), критерий наименьшей значимости разности (LSD-test) и *t*-критерий Стьюдента. Для выборок логарифма $2^{-(N \text{ цикла } M. \text{ musculus}) - (N \text{ цикла } E. \text{ coli после отмены лечения антибиотиками})}$, не описывающихся нормальным распределением, использовали ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса и парный критерий Вилкоксона. Взаимозависимость логарифмов $2^{-(N \text{ цикла } M. \text{ musculus}) - (N \text{ цикла бактерии до лечения антибиотиками})}$ оценивали по коэффициентам корреляции Спирмена. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что до лечения антибиотиками животные разных генотипов (C57BL/6J, *Kaiso*^{-/-}, *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-}) и разного пола имели одинаковое количество *Helicobacter* spp. и *E. coli* (табл. 2). Индивидуальные вариации количества *Helicobacter* spp. и *E. coli* достоверно коррелировали между собой ($r = 0,48$, $n = 28$, $p < 0,05$) (рис. 1). Это хорошо согласуется с представлениями о том, что заселенность толстого кишечника патогенной и симбиотической микрофлорой возрастает при развитии кишечного воспаления (Bulois et al., 1999; Pilarczyk-Zurek et al., 2013). В свою очередь, инфицирование *Helicobacter* spp. может усиливать это воспаление в моделях колита (Monceaux et al., 2013). Действительно, наиболее выраженная взаимозависимость численных значений зараженности *Helicobacter* spp. и *E. coli* была отмечена у мышей с дефицитом кишечного муцина-2 – линии *Kaiso*^{-/-}/*Muc2*^{-/-} ($r = 0,92$, $p < 0,05$, $n = 10$, корреляция Спирмена). У животных двух других генотипов, C57BL/6J и *Kaiso*^{-/-}, коэффициенты корреляции между количеством *Helicobacter* spp. и *E. coli* составляли: $r = -0,07$ ($p > 0,05$, $n = 8$) и $r = 0,53$ ($p > 0,05$, $n = 10$). Кишечное воспаление при разрастании симбиотических и патогенных колоний чаще всего сопровождается различными симптоматическими характеристиками: пролапс прямой кишки, кровь в фекальных массах и диарея (Martino-Cardona et al., 2010). Известно, что энтеротоксин *E. coli* может вызывать диарею посредством воздействия на секреторные механизмы слизистой тонкой кишки (Ghai et al., 1980). Данный симптом присутствовал у всех животных с дефицитом муцина-2.

Нежелательными реакциями на острое кишечное воспаление, вызванное химическими факторами у животных, являются гиперплазия крипт, уплощение эпителиальных клеток, инфильтрация воспалительных клеток, появление поверхностных эрозий и снижение синтеза муцина-2 бокаловидными клетками (Van der Sluis et al., 2006). Оче-

Таблица 2. Количество *Helicobacter* spp. и *E. coli* в фекалиях у животных разных генотипов до начала лечения и через две недели приема антибиотиков

Генотип	Пол	<i>Helicobacter</i> spp.		<i>E. coli</i>	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
C57BL/6J	Самки	0,66 ± 0,20 (4)	Ниже уровня детекции	-1,81 ± 0,49 (4)	2,14 ± 0,25 (4)
	Самцы	0,69 ± 0,22 (4)	Ниже уровня детекции	-1,53 ± 0,37 (4)	2,05 ± 0,23(4)
<i>Kaiso</i> ^{-/-}	Самки	0,72 ± 0,29 (5)	Ниже уровня детекции	-1,94 ± 0,40 (5)	-0,46 ± 1,27(5)
	Самцы	1,20 ± 0,40 (5)	Ниже уровня детекции	-2,39 ± 0,28 (5)	-2,02 ± 1,10 (5)
<i>Muc2</i> ^{-/-} / <i>Kaiso</i> ^{-/-}	Самки	0,87 ± 0,38 (5)	0,0016 ± 0,0015 (5)	-2,31 ± 0,50 (5)	-3,15 ± 0,13 (5)
	Самцы	1,09 ± 0,14 (5)	0,0078 ± 0,0073 (5)	-2,62 ± 0,16 (5)	-2,92 ± 0,27 (5)
Факторный анализ	Эффект генотипа	F _(2,26) = 0,56 NS	H _(2,26) = 10,44 p < 0,01	F _(2,26) = 2,08 NS	F _(2,26) = 22,02 p < 0,001
	Эффект пола	F _(1,26) = 0,98 NS	H _(2,26) = 0,30 NS	F _(1,26) = 0,26 NS	F _(1,26) = 0,66 NS

NS – статистически недостоверно, p > 0,05. Значения представлены в виде логарифма 2^Δ((N цикла *M. musculus*) – (N цикла бактерии)), среднее ± стандартная ошибка (количество случаев).

видными показателями ухудшения состояния животных считаются потеря веса, пролапс и появление кровотечений (Ayres et al., 2012). Через неделю лечения антибиотиками не было выявлено изменений массы тела относительно исходного уровня (рис. 2) у всех исследованных генотипов (F_(2,26) = 0,74, p > 0,05) независимо от их половой принадлежности (F_(1,26) = 0,20, p > 0,05). Однако через две недели антибактериальной терапии влияние генотипа (F_(2,26) = 18,98, p < 0,001), но не пола (F_(1,26) = 0,99, p > 0,05), на привесы становилось статистически значимым и выражалось в наибольших положительных значениях у мышей C57BL/6J (7,93 ± 1,20 %) и отрицательных у линии *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-} (-2,18 ± 2,05 %). Мыши линии *Kaiso*^{-/-} показывали промежуточный прирост массы тела (2,44 ± 2,17 %) (рис. 2).

Несмотря на отсутствие изменений массы тела через одну неделю приема антибиотиков у 8 из 10 мышей линии *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-}, мы отмечали покраснение вокруг анального отверстия, а у одного животного была замечена кровь в фекальных массах. Данные признаки кишечного воспаления отсутствовали у животных других генотипов. Отличие линии *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-} от C57BL/6J и *Kaiso*^{-/-} было статистически значимым: χ² = 13,33, p < 0,001. Через 3 дня после отмены антибиотиков в группе мышей, у которых отсутствует муцин-2 (*Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-}), погибли 4 особи, среди животных двух других линий летального исхода отмечено не было (χ² = 5,0, p < 0,05). Таким образом, лечение антибиотиками инфекции *Helicobacter* spp. у животных с недостатком муцина-2 может быть причиной ухудшения самочувствия, которое впоследствии вызывает летальный исход.

Бактериальное исследование фекалий, собранных через одну неделю после курса стандартной терапии тремя антибиотиками (Kerton, Warden, 2006), показало полное освобождение от *Helicobacter* spp. мышей линий C57BL/6J и *Kaiso*^{-/-}. Вместе с тем у мышей *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-}, выживших после курса терапии, *Helicobacter* spp. был детектирован в 50 % случаев. Зараженность мышей с дефицитом кишечного муцина статистически значимо превосходила таковую у мышей линий C57BL/6J и *Kaiso*^{-/-} (χ² = 6,1, p < 0,05).

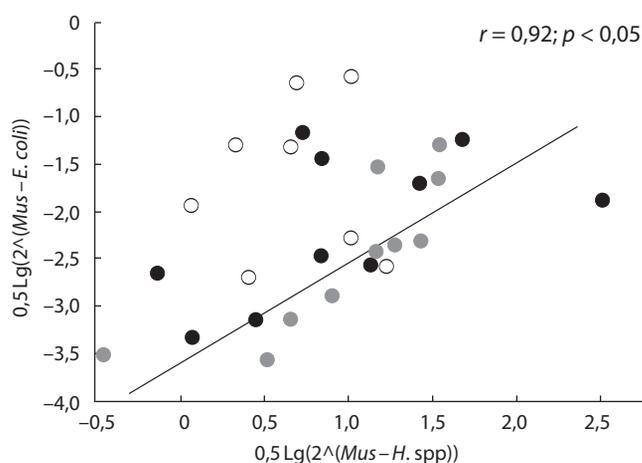


Рис. 1. Зависимость логарифма 2^Δ((N цикла *M. musculus*) – (N цикла *E. coli*)) по оси ординат от логарифма 2^Δ((N цикла *M. musculus*) – (N цикла *H. spp.*)) по оси абсцисс у животных разных генотипов.

C57BL/6J – белые точки; *Kaiso*^{-/-} – черные точки; *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-} – серые точки. Сплошная линия – корреляционная зависимость у мышей линии *Muc2*^{-/-}/*Kaiso*^{-/-}; r – значение корреляции Спирмена для этой линии.

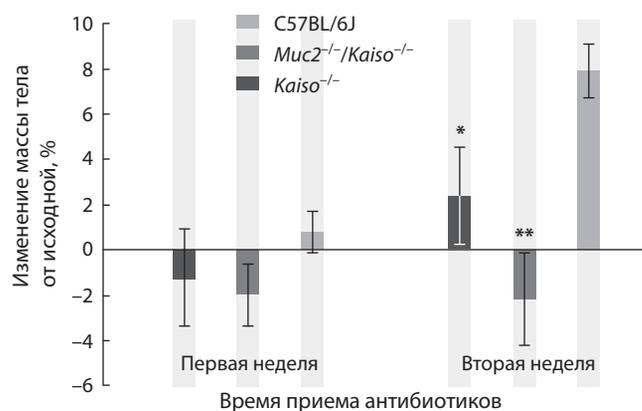


Рис. 2. Изменение массы тела (% от исходной массы) через одну и две недели приема антибиотиков у мышей разных генотипов. * p < 0,05, t-критерий Стьюдента, ** p < 0,001, t-критерий Стьюдента.

Схему лечения тремя антибиотиками с добавлением их в корм успешно применяют для элиминации *Helicobacter* spp. в инфицированных колониях мышей. Преимущество этого метода заключается в отсутствии дополнительных манипуляций с животными, таких как кесарево сечение и пересадка новорожденных на выкармливание суррогатной матери (Martino-Cardona et al., 2010). Однако лечение тремя антибиотиками с добавлением их в корм не всегда эффективно, в частности при устранении *Helicobacter* spp. у животных с иммунодефицитами: Scid/*Trp53*^{-/-}; TCR × Rag; HNT/TCR BALB/c; *Tnf*^{-/-}; B6.129P2-IL10^{tm1Cgn}/J. Несмотря на неэффективность элиминации *Helicobacter* spp. у таких животных, летальных исходов у них отмечено не было (Shomer et al., 1998; Kerton, Warden, 2006; Sharp et al., 2008).

Известно, что реакция организма на терапию антибиотиками зависит от состояния кишечной микрофлоры, нарушение которой может приводить к серьезным осложнениям (Ayres et al., 2012; Kamada et al., 2013). Количество симбиотических бактерий *E. coli*, которые обладают адгезивными свойствами к протеогликану кишечника, до начала приема антибиотиков у мышей всех генотипов было невысокое (табл. 2). Лечение антибиотиками привело к росту колоний *E. coli* в кишечнике, но только у генотипов с нормальной выработкой муцина-2: C57BL/6J и *Kaiso*^{-/-} (парный критерий Вилкоксона $Z = 2,4$, $p < 0,05$ и $Z = 2,5$, $p < 0,05$ соответственно), тогда как у мышей с дефицитом муцина-2 *Muc2*^{-/-}, *Kaiso*^{-/-} количество *E. coli* осталось на прежнем уровне ($Z = 0,25$, $p > 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, лечение антибиотиками мышей с дефицитом муцина-2 может быть не только малоэффективным для элиминации патогена, но и опасным для их жизни. А высокая восприимчивость к токсическому действию антибиотиков дает основание рекомендовать использование мышей с дефицитом муцина-2 в качестве тест-объекта для оценки фармакологической безопасности новых средств антибактериальной терапии.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-07653.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Ayres J.S., Trinidad N.J., Vance R.E. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. *Nat. Med.* 2012;18(5):799-806. DOI: 10.1038/nm.2729
Bergstrom K.S.B., Kisson-Singh V., Gibson D.L., Ma C., Montero M., Sham H.P., Vallance B.A. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog.* 2010;6(5):e1000902. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000902
Bulois P., Desreumaux P., Neut C., Da A., Cortot A., Colombel J.F. Infectious agents and Crohn's disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 1999;5(10):601-604. DOI: 10.1111/j.1469-0691.1999.tb00415.x
Chin E.Y., Dangler C.A., Fox J.G., Schauer D.B. *Helicobacter hepaticus* infection triggers inflammatory bowel disease in T cell recep-

tor alphaeta mutant mice. *Comparative Med.* 2000;50(6):586-594.
Ghai O.P., Menon P.S.N., Bhuu M.K. Pathogenesis of diarrhea due to *Escherichia coli*. *Indian J. Pediatr.* 1980;47(4):311-316. DOI: 10.1007/BF02831325
Hansson G.C., Johansson M.E.V. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut. Microbes.* 2010;1(1):51-54. DOI: 10.4161/gmic.1.1.10470
Kamada N., Chen G.Y., Inohara N., Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* 2013;14(7):685-690. DOI: 10.1038/ni.2608
Kerton A., Warden P. Review of successful treatment for *Helicobacter* species in laboratory mice. *Lab. Anim.* 2006;40(2):115-122. DOI: 10.1258/002367706776319033
Martens E.C., Koropatkin N.M., Smith T.J., Gordon J.I. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: The bacteroidetes sus-like paradigm. *J. Biol. Chem.* 2009;284(37):24673-24677. DOI: 10.1074/jbc.R109.022848
Martino-Cardona M. del C., Beck S.E., Brayton C., Watson J. Eradication of *Helicobacter* spp. by using medicated diet in mice deficient in functional natural killer cells and complement factor D. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2010;49(3):294-299.
Monceaux C.P., Testerman T.L., Boktor M., Jordan P., Adegboyega P., Mcgee D.J., Alexander J.S. *Helicobacter* infection decreases basal colon inflammation, but increases disease activity in experimental IBD. *Open J. Gastroenterol.* 2013;3:177-189. DOI: 10.4236/ojgas.2013.33029
Morgan X.C., Tickle T.L., Sokol H., Gevers D., Devaney K.L., Ward D.V., Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(9):R79. DOI: 10.1186/gb-2012-13-9-r79
Nicklas W., Baneux P., Boot R., Decelle T., Deeny A.A., Fumanelli M., Illgen-Wilcke B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2002;36:20-42.
Nicklas W., Deeny A., Diercks P., Gobbi A., Illgen-Wilcke B., Seidelin M. FELASA guidelines for the accreditation of health monitoring programs and testing laboratories involved in health monitoring. *Lab. Anim.* 2010;39(2):43-48. DOI: 10.1258/la.2009.009086
O'Connor M. Ulcerative Colitis – Treatments, Special Populations and the Future. *Publ.: InTech*, 2011. DOI: 10.5772/2369
Pilarczyk-Zurek M., Chmielarczyk A., Gosiewski T., Tomusiak A., Adamski P., Zwolinska-Wcislo M., Strus M. Possible role of *Escherichia coli* in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol.* 2013;13(1):61. DOI: 10.1186/1471-230X-13-61
Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 2007;317(5834):124-127. DOI: 10.1126/science.1140488
Sharp J.M., Vanderford D.A., Chichlowski M., Myles M.H., Hale L.P. *Helicobacter* infection decreases reproductive performance of IL10-deficient mice. *Comparative Med.* 2008;58(5):447-453.
Shomer N.H., Dangler C.A., Marini R.P., Fox J.G. *Helicobacter bilis/ Helicobacter rodentium* co-infection associated with diarrhea in a colony of SCID mice. *Lab. Anim. Sci.* 1998;48(5):455-459.
Ubeda C., Taur Y., Jenq R.R., Equinda M.J., Son T., Samstein M., Pamer E.G. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J. Clin. Invest.* 2010;120(12):4332-4341. DOI: 10.1172/JCI43918
Van der Sluis M., de Koning B.A.E., de Bruijn A.C.J.M., Velcich A., Meijerink J.P.P., van Goudoever J.B., Einerhand A.W.C. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 2006;131(1):117-129. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.04.020
Wlodarska M., Willing B., Keeney K.M., Menendez A., Bergstrom K.S., Gill N., Finlay B.B. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect. Immun.* 2011;79(4):1536-1545. DOI: 10.1128/IAI.01104-10



Возможности высокотехнологичного фенотипирования методом спектроскопии ЯМР на примере метаболического отклика печени крыс на воздействие алкоголя и Рейши

М.С. Крестина^{1,3}, О.Б. Шевелев², И.В. Коптюг¹, Л.А. Герлинская², С.Е. Пельтек², А.Е. Акулов²

¹ Учреждение Российской академии наук Институт «Международный томографический центр» СО РАН, Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Для оценки эффективности спектроскопии протонного ядерно-магнитного резонанса (¹H ЯМР) как метода метаболомного фенотипирования и метода детектирования ранних метаболических изменений при токсических воздействиях было проведено метаболическое профилирование печени крыс. Образцы тканей были взяты у трех групп крыс: группа К – контрольные животные; группа А – животные, получавшие многократно 15-процентный раствор алкоголя, прием которого не вызывал патологических изменений печени, но стимулировал пролиферацию гепатоцитов, и алкоголя в сочетании с растительным гепатопротекторным препаратом Рейши, *Ganoderma lucidum*, (группа А + Р). Как следует из полученных результатов, изменения концентрации метаболитов в печени, наблюдаемые в группе А, отражали типичную метаболическую реакцию на прием алкоголя и выражались в снижении содержания глицина, лейцина, изолейцина, валина, холина и лактата, а также в повышении уровня ТМАО. При приеме Рейши у крыс группы А + Р восстанавливалась концентрация глицина, валина и ТМАО. Кроме того, в группе А + Р было отмечено увеличение относительно контроля концентрации НАД, АТФ, УТФ, сукцината, пиранозы и ацетата. Индивидуальные вариации содержания валина, изолейцина, лейцина, лактата, холина и пиранозы коррелировали с числом двуядерных гепатоцитов как индикатором пролиферативной активности. Таким образом, исследование тканей печени методом спектроскопии ЯМР ¹H позволяет выявить ранние отклонения уровня метаболитов при хроническом потреблении небольших доз алкоголя и может быть перспективным подходом как для диагностического выявления алкогольного повреждения печени, так и для оценки эффективности применяемой лекарственной терапии.

Ключевые слова: крысы Sprague-Dawley; печень; алкоголь; *Ganoderma lucidum*; спектроскопия ЯМР ¹H; *in vitro*; метабономика; диагностика ранних метаболических нарушений.

NMR metabolic profiling of the liver following administration of alcohol and the mushroom *Ganoderma lucidum* in rats

M.S. Krestina^{1,3}, O.B. Shevelev², I.V. Koptug¹, L.A. Gerlinskaya², S.E. Peltek², A.E. Akulov²

¹ International Tomography Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

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

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

We have evaluated the efficiency of a metabonomic approach to metabolic phenotyping and detection of early metabolic changes under a toxic influence. For this purpose, a metabolic profiling of rat liver was performed with ¹H NMR spectroscopy. Rat tissues from animals in three groups were analyzed. Group C consisted of control animals; animals in group A received alcohol repeatedly (15 % ethanol); and animals in group A + R received alcohol in combination with a hepatoprotective herbal medicine (Reishi, *Ganoderma lucidum*) repeatedly. Noteworthy, alcohol consumption did not cause pathological changes, but stimulated hepatocyte proliferation. Our data suggest that changes in metabolite concentrations in A represent a typical metabolic response to alcohol consumption, namely decrease in glycine, leucine, isoleucine, valine, choline and lactate content, and increase in TMAO content. Treatment with Reishi (A + R) had positive effects, in that it restored the levels of glycine, valine and TMAO. Furthermore, increase in NAD, ATP, UTP, succinate, pyranose, and acetate concentrations was observed in A + R. A correlation was found between the valine, isoleucine, lactate, choline, and pyranose content and the number of binuclear hepatocytes. Binuclear hepatocytes indicate proliferative activity, and the concentration of the metabolites participating in the formation of new hepatic cells decreases. Thus, the study of liver tissues by ¹H NMR spectroscopy allows for detection of early changes in metabolite concentrations following chronic consumption of alcohol at insignificant doses. Consequently, ¹H NMR spectro-

scopy can serve as a promising approach to detecting alcohol-related liver pathologies and assessing the efficiency of the therapy used.

Key words: Sprague-Dawley rats; liver; alcohol; *Ganoderma lucidum*; ^1H NMR spectroscopy; *in vitro*; metabonomics; diagnosis of early metabolic disorders.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Крестина М.С., Шевелев О.Б., Коптюг И.В., Герлинская Л.А., Пельтек С.Е., Акулов А.Е. Возможности высокотехнологичного фенотипирования методом спектроскопии ЯМР на примере метаболического отклика печени крыс на воздействие алкоголя и Рейши. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):499-504. DOI 10.18699/VJ15.067

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Krestina M.S., Shevelev O.B., Koptuyug I.V., Gerlinskaya L.A., Peltek S.E., Akulov A.E. NMR metabolic profiling of the liver following administration of alcohol and the mushroom *Ganoderma lucidum* in rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):499-504. DOI 10.18699/VJ15.067

Алкоголь можно отнести к одному из наиболее распространенных агентов токсической нагрузки на организм человека. Воздействие алкоголя сказывается на обменных процессах, протекающих в организме, что может приводить к нарушению нормального функционирования как отдельных органов, так и целых систем. Известно, что наибольшую токсическую нагрузку при употреблении алкоголя испытывает печень как основной орган детоксикации (Lieber, 2004). Повреждение печени может происходить не только при одновременном воздействии большой дозы алкоголя, но и при хроническом потреблении малых доз (Romero-Martínez, Moya-Albiol, 2013). Подобное воздействие алкоголя способно приводить к жировой дистрофии печени, фиброзу и в итоге к алкогольному циррозу печени и даже гепатоцеллюлярной карциноме (Vruha et al., 2012). Важно отметить, что до этапа алкогольного цирроза повреждения печени носят обратимый характер, что актуализирует развитие методов ранней диагностики повреждений органа.

Вместе с тем наравне с развитием методов выявления патологии и определения ее стадии остро стоит вопрос развития методов контроля эффективности лечебных и профилактических средств. Основными требованиями к таким методам служат малая инвазивность и высокая информативность. К ним можно отнести метод спектроскопии ЯМР. В настоящее время ведутся работы, направленные на применение спектроскопии ЯМР для диагностики повреждений печени или мозга при анализе образцов крови и/или мочи (Gika, Wilson, 2014). Это возможно благодаря тому, что ЯМР позволяет получать количественную информацию о большом числе метаболитов, вовлеченных в разные метаболические пути. Что, в свою очередь, помогает найти критические точки в обменных процессах, воздействие на которые может минимизировать негативное влияние алкоголя или эффективно корректировать уже сложившееся метаболическое нарушение. Вопрос применения спектроскопии ЯМР тканей печени в качестве диагностического метода остается дискуссионным и открытым, но на данном этапе развития он может выступать в роли технологического сопровождения при проверке эффективности экспериментальных препаратов, проходящих доклинические испытания на животных, а также при фенотипировании генетических линий животных, склонных к врожденным нарушениям метаболизма.

Прекращение потребления алкоголя и назначение специальной диеты на поздних стадиях развития патологии

не приводят к выздоровлению, для этого требуется эффективная лекарственная терапия. Для восстановления нормальной функции печени разрабатываются препараты, обладающие гепатопротекторными свойствами. Большинство из них направлено на восстановление мембран клеток (фосфолипиды) или компенсацию отдельных метаболитов, вовлеченных в процессы детоксикации. Вместе с тем в качестве гепатопротекторных не раз использовались препараты растительного происхождения (Kushnerova et al., 2014; Fehér et al., 2015): экстракт древесины мааки амурской (*Maackia amurensis ligni*), экстракт плодов расторопши пятнистой (*Silybi mariani fructuum*). Эффективность таких препаратов может заключаться в содержании в экстрактах целого комплекса биологически активных компонентов. К ним относится Рейши (в соответствии с названием, принятым в китайской медицине), который изготавливается из экстракта гриба *Ganoderma lucidum*. Рейши успешно используется для лечения хронических заболеваний печени различной этиологии. Предполагается, что защиту от повреждений печени, вызванных токсинами или этанолом, обеспечивают входящие в состав Рейши тритерпеноиды и полисахариды (Gao et al., 2003). Тритерпеноиды обладают антиоксидантной активностью и способны связывать свободные радикалы (Wang et al., 2000; Shi et al., 2008), а полисахариды эффективно ингибируют развитие окислительного стресса в мозге при гипоксии и реоксигенации (Zhao et al., 2004). Терапевтическая эффективность Рейши была также продемонстрирована на моделях гепатостеатоза (Shieh et al., 2001) и экспериментально индуцированного фиброза печени (Wu et al., 2010).

В данном исследовании была проведена *in vitro* спектроскопия ЯМР ^1H тканей печени крыс линии Sprague-Dawley после хронического потребления небольших доз алкоголя (15 %-й этанол) и совместного приема алкоголя с Рейши. Данные спектроскопии *in vitro* были сопоставлены с полученными на тех же животных показателями пролиферативной активности печени (Shevelev et al., 2015).

Материалы и методы

Моделирование хронического воздействия алкоголя и лекарственная терапия выполнены на 29 лабораторных крысах аутбредной линии Sprague-Dawley в возрасте 8–9 нед на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). Животных содержали по одному

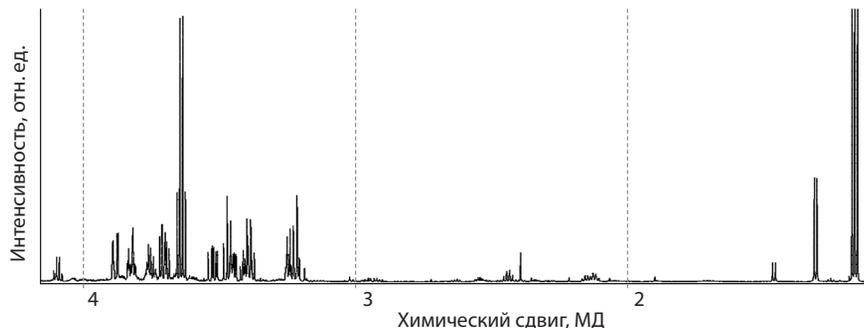
в индивидуально вентилируемых клетках высотой 20,5 см и площадью 929 см² (OptiRAT cage, Charles River Laboratories, Франция) при свободном доступе к воде и гранулированному корму для лабораторных грызунов SPF-категории «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия), искусственном фотопериоде 14С:10Т, температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. В качестве подстилочного материала использовались сухие обеспыленные опилки (ООО «Альбион», г. Новосибирск). Корм и подстилку перед использованием автоклавировали при температуре 121 °С. Для поения животных использовали деионизированную воду, полученную на установке Millipore, после обогащения минеральной добавкой «Северянка» (ООО «Эко-Проект», г. Санкт-Петербург).

В качестве лекарственной терапии в данной работе использовали экстракт гриба Рейши, который относится к виду *Ganoderma lucidum*. Данный гриб был собран в Алтайском крае, высушен и измельчен до размера частиц не более 150 мкм (MAN-30, ЗАО MVM, Россия). Затем сухие измельченные грибы разводили в 1 мл деионизированной воды, полученной на установке Millipore. Необходимая концентрация Рейши составляла 100 мг/кг (Kwon, Kim, 2011), поскольку средний вес животных на момент начала исследования составлял 330 г, концентрация грибов в суспензии выбрана равной 33 мг/мл. Суспензия приготавливалась ежедневно непосредственно перед использованием, затем препарат вводился с помощью желудочного зонда.

Животные были разделены на три группы:

1) экспериментальная – алкоголь + Рейши: животным ($n = 9$) внутрижелудочно вводили по 1 мл раствора Рейши каждый день. С 6-го по 26-й дни эксперимента животные получали 15 %-й этанол. Для этого в начале темного периода поилки с водой из клеток заменяли на поилки с 15 %-м этанолом. Через 16 ч животным возвращали воду и убирали этанол. Потребление воды и алкоголя измеряли ежедневно взвешиванием поилок;

2) экспериментальная группа – алкоголь: вместо Рейши животные ($n = 10$) получали внутрижелудочно



Спектр экстракта метаболитов ткани печени крысы ЯМР ¹H 700 МГц.

воду. С 6-го по 26-й дни эксперимента, как и в предыдущей группе, животные получали 15 %-й этанол, который давали в соответствии с описанным выше протоколом;

3) контрольная группа: животные ($n = 10$) получали с 1-го по 6-й дни эксперимента воду внутрижелудочно, с 6-го по 26-й дни – в поилках, которые меняли, но в них была только вода.

На 27-й день эксперимента крысы были умерщвлены, печень извлекали и замораживали при –80 °С (кельвинатор, SANYO MDF-594) для дальнейшего анализа с помощью *in vitro* спектроскопии ЯМР ¹H. Непосредственно перед спектроскопией образцы размораживали и подготавливали в соответствии со следующим протоколом: 1) гомогенизация ткани (гомогенизатор Поттера–Эльвейема, 70 мг ткани, 700 мкл 80 %-го этанола); 2) обработка ультразвуком (ультразвуковой прибор QSonica q700, 300 Вт, 5 мин); 3) перемешивание на шейкере (BioSan Vortex V-1 plus, 5 мин); 4) центрифугирование (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 30 мин, 40 °С, 13 200 об./мин); 5) отделение части пробы, не выпавшей в осадок; 6) удаление водонерастворимых веществ; для лучшего разделения на фракции к этанольной экстракции добавляли хлороформ (Sigma-Aldrich, США) и воду (Millipore) в пропорциях 1 : 1; 7) центрифугирование (EPPENDORF Centrifuge 5810R, 30 мин, 40 °С, 13 200 об./мин); 8) повторение стадий (5), (6), (7); 9) отделение верхней водорастворимой фракции; 10) дегидратация на вакуумном испарителе (RVC 2-25 CD plus «Christ», 24 ч, 250 °С, 1 000 об./мин); 11) после дегидратации вещество растворяли в дейтерированной воде (99,9 %, Sigma-Aldrich, 600 мкл), затем перемешивали на шейкере (BioSan Vortex V-1 plus 5 мин) и обрабатывали ультразвуком (ультразвуковая ванна Сапфир, 20 мин).

Спектроскопия ЯМР ¹H выполнена на высокопольном спектрометре Bruker Avance III 700 МГц, оборудованном криодатчиком Cryoprobe Prodigy. Для получения спектров ЯМР ¹H использовалась одноимпульсная последовательность (90° импульс длительностью 7,7 мкс), после чего записывался спад свободной индукции, задержка между накоплениями составляла 17 с. Продолжительность накопления составила 1 ч 5 мин, включала 4 пустых скана и 128 сканов накопления. На рисунке приведен типичный спектр метаболитов печени.

С помощью баз данных Biological Magnetic Resonance Data Bank, Human Metabolome Data Base и литературного анализа (Roslund et al., 2008; Psychogios et al., 2011; Feng et al., 2013) путем сравнения спектров, полученных в отдельности для каждого вещества из баз данных, и экспериментальных (программа, используемая для сравнения, написана на Delphi И.В. Коптюгом) были идентифицированы метаболиты, соответствующие наиболее интенсивным пикам в спектрах ЯМР. Помимо сравнения с базами данных, для проверки часть метаболитов (аланин, валин, глицин, глутатион, глутамин, изолейцин, креатин, лейцин, пролин, фенилаланин, холин, тирозин, D-глюкоза и НАД, Sigma-Aldrich) добавляли в исследуемый образец для установления концентрационной зависимости, что служило критерием достоверности соотношения пиков.

Для определения концентрации было проведено суммирование площадей пиков, относящихся к каждому из выделенных метаболитов. Полученные в хо-

Содержание метаболитов в печени контрольных и экспериментальных групп крыс (у.е.)

Метаболит	Контроль (n = 10)	Алкоголь (n = 10)	Алкоголь + Рейши (n = 9)
АТФ	9,5±0,8	9,7±0,7	11,5±1,0
Аргинин	5,9±0,7	6,2±0,3	6,9±0,2
Ацетат	6,6±0,5	6,2±0,4	8,2±0,9 [#]
Аланин	30,0±0,7	26,7±1,2	28,1±2,0
Валин	14,7±0,6	11,8±0,6 [*]	12,8±0,6
Гистидин	3,2±0,3	3,2±0,2	3,5±0,1
Глицин	32,2±1,9	26,2±1,7 [*]	31,2±2,1
Глутатион	2,7±0,2	3,1±0,2	2,8±0,2
Глутамин	59,2±2,7	54,9±7,0	63,5±1,9
Глутамат	13,2±1,0	13,8±0,5	14,4±0,8
Изолейцин	9,8±0,4	7,6±0,3 [*]	8,3±0,5 [*]
Креатин	5,0±0,6	4,3±0,4	4,5±0,4
Лактат	292,1±9,5	248,0±6,9 [*]	249,4±9,2 [*]
Лейцин	8,1±0,3	6,7±0,2 [*]	6,7±0,3 [*]
Мио-инозитол	41,9±2,4	40,3±2,5	42,5±3,1
NAD	6,2±0,4	6,8±0,6	7,9±0,4 [*]
Пролин	8,6±0,7	8,2±0,4	8,8±0,4
Сукцинат	35,9±2,6	31,9±0,8	40,0±2,9 [#]
ТМАО	123,5±14,2	194,4±10,1 [*]	148,3±15,8 [#]
УТФ	1,2±0,3	1,2±0,2	3,1±0,8 ^{* #}
Фенилаланин	4,8±0,4	4,0±0,2	4,9±0,4
Фумаровая кислота	1,3±0,2	1,4±0,1	1,3±0,2
Холин	25,4±1,8	18,0±1,2 [*]	18,3±1,4 [*]
α-пириноза	161,8±3,1	158,9±3,3	171,0±4,2 [#]
β-гидроксипутират	1,9±0,1	1,9±0,1	2,0±0,1
α-гидроксипутират	4,4±0,3	3,7±0,2	4,2±0,3

* – Достоверное отличие от контроля: $p < 0,05$; # – достоверное различие между группами алкоголь и алкоголь + Рейши: $p < 0,05$. В обоих случаях использовался LSD-тест.

де интегрирования данные обрабатывались с помощью пакета статистических методов Statistica 6.0. Для установления принадлежности экспериментальных данных к нормальному распределению использовался критерий Колмогорова–Смирнова. Данные были представлены в виде средних величин со среднеквадратичными ошибками. Установление достоверных различий средних для метаболитов между группами проведено с помощью множественного сравнения средних (LSD-тест). Взаимозависимость между содержанием метаболитов и числом двуядерных гепатоцитов оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

Хроническое потребление небольших доз алкоголя привело к снижению уровня ряда аминокислот, валина, глицина, изолейцина, лейцина, а также лактата, холина, и повышению уровня ТМАО (таблица). Прием Рейши на фоне потребления алкоголя восстанавливал уровни валина, глицина, ТМАО, при этом уровни изолейцина,

лейцина, лактата и холина оставались измененными относительно контроля. Вместе с тем в группе алкоголь + Рейши отмечалось увеличение, в сравнении с контролем, НАД, АТФ, УТФ, сукцината, пиринозы и ацетата.

Обсуждение

Проведенный ранее анализ показал, что использованная в работе доза алкоголя не вызывала патологических изменений печени, а лишь стимулировала процессы пролиферации как адаптивную реакцию органа на повышенную функциональную (в данном случае детоксицирующую) нагрузку (Shevelev et al., 2015). Вместе с тем даже при столь умеренной дозе алкоголя методом спектроскопии ЯМР ¹Н были установлены существенные изменения в содержании ряда метаболитов печени. Прежде всего, обращает на себя внимание падение концентрации ряда аминокислот: глицина, лейцина, изолейцина и валина, три из которых (лейцин, изолейцин и валин) относятся к незаменимым аминокислотам с разветвленными цепочками – BCAA (Branched-Chain Amino Acids). Как известно,

ВСАА являются исходным продуктом, необходимым для синтеза белка, субстратом для выработки энергии или синтеза иных аминокислот, в особенности глутамина и аланина, а также участвуют в сжигании излишних жиров за счет повышения лептина в адипоцитах (Nelson, Cox, 2008). Пониженный уровень этих аминокислот под влиянием алкоголя может быть трактован в пользу предположения о расходовании их на синтез белка, поскольку, как показали гистологические препараты печени исследованных животных, на этой стадии происходит увеличение числа двуядерных гепатоцитов (Shevelev et al., 2015). Вовлеченность данных аминокислот в процесс пролиферации подтверждается тем, что у крыс, получавших алкоголь, отмечены статистически значимые коэффициенты корреляции с числом двуядерных гепатоцитов для содержания в печени изолейцина ($r = -0,51, p < 0,05$) и лейцина ($r = -0,56, p < 0,05$), а для крыс, получавших алкоголь и Рейши, – валина ($r = -0,63, p < 0,05$) и изолейцина ($r = -0,71, p < 0,01$).

Усиленное деление клеток приводит к увеличению размеров печени – это приспособительная реакция организма в борьбе с длительной токсической нагрузкой, поскольку имеющейся емкости механизмов, способных нейтрализовать определенное количество этанола в единицу времени, становится недостаточно. Подобное снижение концентрации аминокислот также продемонстрировано в работах с хроническим воздействием больших доз алкоголя (Jang et al., 2012; Shayakhmetova et al., 2015). При этом в ряде работ показано положительное влияние на метаболизм печени увеличения в рационе питания ВСАА (Malaguarnera et al., 2009; Kato et al., 2013).

Еще одним метаболитом, концентрация которого снизилась в ответ на воздействие алкоголя, является холин, участвующий в синтезе фосфолипидов клеточных мембран. Уменьшение холина может свидетельствовать о повышенном запросе на него в организме при активном клеточном делении (Bollard et al., 2010), что хорошо согласуется с отрицательной корреляцией между уровнем холина в печени и числом двуядерных гепатоцитов в группах крыс, получавших алкоголь ($r = -0,61, p < 0,05$) и алкоголь в сочетании с Рейши ($r = -0,59, p < 0,05$).

В группах животных, получавших алкоголь и алкоголь + Рейши, наблюдается уменьшение концентрации лактата, уровень которого отрицательно коррелирует с числом двуядерных гепатоцитов: $r = -0,61 (p < 0,05)$ для группы алкоголь и $r = -0,50 (p < 0,05)$ – для группы алкоголь + Рейши. Этот факт отражает расходование лактата на синтез глюкозы через превращение в пируват, который в процессе глюконеогенеза синтезируется в глюкозу. Так как концентрация лактата уменьшается, то нужно рассматривать его участие в глюконеогенезе, но известно, что потребление этанола ингибирует этот процесс на 45 % (Siler et al., 1998). Помимо литературных данных, в нашем исследовании также не наблюдается повышения концентрации α -пиранозы. Таким образом, нужно рассматривать другие метаболические пути, в которых участвует пируват, являющийся промежуточным звеном многих процессов. Он может перейти в ацетил-КоА, который участвует в цикле Кребса, либо служит отправной точкой в синтезе жирных кислот и кетоновых тел. Также

он может расходоваться на образование оксалоацетата или малата. Так как изменение лактата однонаправленно с изменением холина и α -гидроксипирувата, то можно предположить, что уменьшение лактата приводит к увеличению ацетил-КоА, синтезу и накоплению жирных кислот в печени. Такое же изменение уровня лактата при воздействии алкоголя было продемонстрировано в работе Nicholas с соавт. (2008).

Еще одно обстоятельство, которое следует рассматривать при анализе *in vitro* метаболитов энергетического обмена (лактат, НАД, УТФ и др.), связано с их чрезвычайно высокой динамичностью, в частности активация гликолиза и соответствующее увеличение концентрации лактата в тканях развиваются до значимых уровней в течение нескольких секунд. Поэтому при большей интенсивности энергообмена можно наблюдать увеличение уровня лактата, обусловленное временем от момента забоя животного до помещения органа в холод.

Единственным увеличившим свою концентрацию метаболитом при воздействии алкоголя стал ТМАО. Р. Коэт и его коллеги провели исследование (Koeth et al., 2013), в ходе которого животных кормили пищей, обогащенной ТМАО. В результате было обнаружено, что ТМАО изменяет метаболизм холестерина в кишечнике, печени и стенке артерии. В присутствии ТМАО метаболизм холестерина увеличивается и происходит его повышенное накопление. При этом показано, что чрезмерное употребление продуктов с большим содержанием ТМАО (морепродукты, яйца, красное мясо, соя, некоторые энергетические напитки), а также его предшественников, карнитина или лецитина, может привести к формированию атеросклеротических бляшек (Tang et al., 2013). Это позволяет сделать вывод о том, что избыток ТМАО может приводить к накоплению жиров.

Сочетанный прием алкоголя и Рейши поддерживает концентрацию ТМАО, глицина и валина на уровне контрольных значений. Подобный эффект не может быть объяснен увеличенным поступлением этих веществ в организм в составе Рейши. Хотя есть работы, показывающие наличие целого ряда аминокислот в экстракте гриба *Ganoderma lucidum* (Wen et al., 2010), содержание их низкое, а количество экстракта, вводимого животным, мало и в сравнении с аминокислотами пищи, доступной животным в эксперименте, и составляет отношение 1 : 5 000. Подобное влияние, однако, можно объяснить повышением в тканях печени при приеме Рейши таких энергетических субстратов, как НАД, УТФ, сукцинат и α -пираноза, что, в свою очередь, может снижать пролиферативную активность гепатоцитов (Shevelev et al., 2015).

Таким образом, наше исследование демонстрирует возможность обнаружения методом *in vitro* спектроскопии ЯМР ^1H раннего изменения метаболического профиля печени при длительном воздействии небольших доз алкоголя. Также при помощи данного метода удалось установить положительные эффекты гепатопротекторного препарата растительного происхождения Рейши. Его прием приводит к частичному восстановлению метаболических отклонений, возникших при хроническом воздействии алкоголя. Полученные данные открывают перспективы применения спектроскопии ЯМР для провер-

ки эффективности экспериментальных препаратов, проходящих доклинические испытания на животных, а также при фенотипировании генетических линий животных, склонных к врожденным нарушениям метаболизма.

Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-35-00020).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Bollard M.E., Contel N.R., Ebbels T.M., Smith L., Beckonert O., Cantor G.H., Lehman-McKeeman L., Holmes E.C., Lindon J.C., Nicholson J.K., Keun H.C. NMR-based metabolic profiling identifies biomarkers of liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *J. Proteome Res.* 2010;9(1):59-69. DOI: 10.1021/pr900200v
- Bruha R., Dvorak K., Petryl J. Alcoholic liver disease. *World. J. Hepatol.* 2012;4(3):81-90. DOI: 10.4254/wjh.v4.i3.81
- Fehér P., Ujhelyi Z., Vecsernyés M., Fenyvesi F., Damache G., Ardelean A., Costache M., Dinischioti A., Hermenean A., Bácskay I. Hepatoprotective effects of a self-micro emulsifying drug delivery system containing *Silybum marianum* native seed oil against experimentally induced liver injury. *Pharmazie.* 2015;70(4):231-238. DOI: 10.1691/ph.2015.4146
- Feng J., Isern N.J., Burton S.D., Zhi Hu J. Studies of secondary melanoma on C57BL/6J mouse liver using ¹H NMR metabolomic. *Metabolites.* 2013;3(4):1011-1035. DOI: 10.3390/metabo3041011
- Gao Y., Zhou S., Jiang W., Huang M., Dai X. Effects of ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. *Immunol. Invest.* 2003;32(3):201-215. DOI: 10.1081/IMM-120022979
- Gika H.G., Wilson I.D. Global metabolic profiling for the study of alcohol-related disorders. *Bioanalysis.* 2014;6(1):59-77. DOI: 10.4155/bio.13.301
- Jang Z.H., Chung H.C., Ahn Y.G., Kwon Y.K., Kim J.S., Ryu J.H., Ryu Do H., Kim C.H., Hwang G.S. Metabolic profiling of analcoholic fatty liver in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol. Biosyst.* 2012;8(7):2001-2009. DOI: 10.1039/c2mb25073j
- Kato A., Tanaka H., Kawaguchi T., Kanazawa H., Iwasa M., Sakaida I., Moriwaki H., Murawaki Y., Suzuki K., Okita K. Nutritional management contributes to improvement in minimal hepatic encephalopathy and quality of life in patients with liver cirrhosis: A preliminary, prospective, open-label study. *Hepatol. Res.* 2013;43(5):452-458. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2012.01092.x
- Koeth R.A., Wang Z., Levison B.S., Buffa J.A., Org E., Sheehy B.T., Britt E.B., Fu X., Wu Y., Li L., Smith J.D., DiDonato J.A., Chen J., Li H., Wu G.D., Lewis J.D., Warriar M., Brown J.M., Krauss R.M., Tang W.H., Bushman F.D., Lusis A.J., Hazen S.L. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* 2013;19(5):576-585. DOI: 10.1038/nm.3145
- Kushnerova N.F., Fedoreev S.A., Fomenko S.E., Sprygin V.G., Kulesh N.I., Mishchenko N.P., Veselova M.V., Momot T.V. Hepatoprotective properties of isoflavonoids from roots of *Maackia amurensis* on experimental carbon tetrachloride-induced hepatic damage. *Eksp. Klin. Farmakol.* 2014;77(2):26-30.
- Kwon S.C., Kim Y.B. Antifibrotic activity a fermentation filtrate of *Ganoderma lucidum*. *Lab. Anim. Res.* 2011;27(4):369-371. DOI: 10.5625/lar.2011.27.4.369
- Lieber C.S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol.* 2004;34(1):9-19. DOI: 10.1016/j.alcohol.2004.07.008
- Malaguarnera M., Risino C., Cammalleri L., Malaguarnera L., Asuto M., Vecchio I., Rampello L. Branched chain amino acids supplemented with L-acetylcarnitine versus BCAA treatment in hepatic coma: a randomized and controlled double blind study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2009;21(7):762-770. DOI: 10.1097/MEG.0b013e328309c791
- Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman; Fifth Edition, 2008.
- Nicholas P.C., Kim D., Crews F.T., Macdonald J.M. 1H NMR-based metabolomic analysis of liver, serum, and brain following ethanol administration in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 2008;21(2):408-420. DOI: 10.1021/tx700324t
- Psychogios N., Hau D.D., Peng J., Gui A.C., Mandal R., Bouatra S., Sinelnikov I., Krishnamurthy R., Eisner R., Gautam B., Young N., Xia J., Knox C., Dong E., Huang P., Hollander Z., Pedersen T.L., Smith S.R., Bamforth F., Greiner R., McManus B., Newman J.W., Goodfriend T., Wishart D.S. The human serum metabolome. *PLoS ONE.* 2011;6(2):e16957. DOI: 10.1371/journal.pone.0016957
- Romero-Martínez Á., Moya-Albiol L. Neuropsychology of perpetrators of domestic violence: the role of traumatic brain injury and alcohol abuse and/or dependence. *Rev. Neurol.* 2013;57(11):515-522.
- Roslundet M.U., Tahtinen P., Niemitz M., Sjöholm R. Complete assignments of the ¹H and ¹³C chemical shifts and J_{HH} coupling constants in NMR spectra of d-glucopyranose and all d-glucopyranosyl-d-glucopyranosides. *Carbohydr. Res.* 2008;343(1):101-112. DOI: 10.1016/j.carres.2007.10.008
- Shayakhmetova G.M., Bondarenko L.B., Kovalenko V.M., Kharchenko O.L., Bohun L.I., Omelchenko Y.O. Multiparameter rodent chronic model for complex evaluation of alcoholism-mediated metabolic violations. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 2015;26(1):43-51. DOI: 10.1515/jbcpp-2013-0163
- Shevelev O.B., Akulov A.E., Dotsenko A.S., Kontsevaya G.V., Zolotykh M.A., Gerlinskaya L.A., Veprev S.G., Goryachkovskaya T.N., Zhukova N.A., Kolchanov N.A., Pel'tek S.E., Moshkin M.P. Neuro-metabolic effect of Altaian fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) in rats under moderate alcohol consumption. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2015;39(7):1128-1136. DOI: 10.1111/acer.12758
- Shi Y., Sun J., He H., Guo H., Zhang S. Hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides against D-galactosamine-induced liver injury in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2008;117(3):415-419. DOI: 10.1016/j.jep.2008.02.023
- Shieh Y.H., Liu C.F., Huang Y.K., Yang J.Y., Wu I.L., Lin C.H., Li S.C. Evaluation of the hepatic and renal-protective effects of *Ganoderma lucidum* in mice. *Am. J. Chin. Med.* 2001;29(3/4):501-507. DOI: 10.1142/S0192415X01000526
- Siler S.Q., Neese R.A., Christiansen M.P., Hellerstein M.K. The inhibition of gluconeogenesis following alcohol in humans. *Am. J. Physiol.* 1998;275(5 Pt 1):E897-E907.
- Tang W.H., Wang Z., Levison B.S., Koeth R.A., Britt E.B., Fu X., Wu Y., Hazen S.L. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(17):1575-1584. DOI: 10.1056/NEJMoa1109400
- Wang M.Y., Liu Q., Che Q.M., Lin Z.B. Effects of total triterpenoids extract from *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr) P Karst (Reishi mushroom) on experimental liver injury models induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine in mice. *Acta Pharmaceut Sin.* 2000;35:326-329.
- Wen H., Kang S., Song Y., Song Y., Sung S.H., Park S. Differentiation of cultivation sources of *Ganoderma lucidum* by NMR-based metabolomics approach. *Phytochem. Anal.* 2010;21(1):73-79. DOI: 10.1002/pca.1166
- Wu Y.W., Fang H.L., Lin W.C. Post-treatment of *Ganoderma lucidum* reduced liver fibrosis induced by thioacetamide in mice. *Phytother. Res.* 2010;24(4):494-499. DOI: 10.1002/ptr.2949
- Zhao H.B., Lin S.Q., Liu J.H., Lin Z.B. Polysaccharide extract isolated from *ganoderma lucidum* protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *J. Pharmacol. Sci.* 2004;95(2):294-298. DOI: 10.1254/jphs.SC0040011