

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 6 выпусков в год

Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия);
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия);
А. Бёрнер – д-р наук (Германия); *В.М. Говорун* – 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. Керкус* – 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. Rogozin* – 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. Амстиславская – д-р биол. наук, доцент (Россия);
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия); *Ю.С. Аульченко* – д-р биол. наук (Россия); *Д.А. Афонников* – канд. биол. наук, доцент (Россия); *Л.И. Афтанас* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия); *Е.В. Березиков* – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды); *С.А. Боринская* – д-р биол. наук (Россия); *П.М. Бородин* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *М.И. Воевода* – 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, проф. (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, проф. (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)

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 6 times annually

Founders

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

Executive Secretary

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

Editorial council

V.S. Baranov, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *L.A. Bespalova*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Agriculture); *A. Börner*, Dr. Sci. (Germany); *M.F. Chernov*, Dr. Sci. (Medicine), Japan; *V.M. Govorun*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany; *G.L. Dianov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain; *Yu.E. Dubrova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain; *J. Le Gouis*, Dr. Sci., France; *S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.E. Kerkis*, Dr. Sci., Brazil; *L.V. Khotyleva*, Full Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus; *E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *A.V. Kilchevsky*, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus; *S.V. Kostrov*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Chemistry), Russia; *B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands; *V.I. Molodin*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (History), Russia; *V.P. Puzyrev*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *I.B. Rogozin*, Cand. Sci. (Biology), United States; *A.O. Ruvinsky*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia; *A.Yu. Rzhetsky*, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States; *S.V. Shestakov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *K.G. Skryabin*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *K.V. Slavin*, Professor, Dr. Sci., United States; *I.A. Tikhonovich*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *N.K. Yankovsky*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia; *L.I. Aftanas*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *T.G. Amstislavskaya*, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia; *Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *E.V. Berezikov*, Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia – Netherlands; *S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.N. Danilenko*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *E.A. Dolgikh*, Cand. Sci. (Biology), Russia; *N.N. Dygalo*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *T.A. Gavrilenko*, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *S.L. Kiselev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *A.V. Kochetov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *Yu.M. Konstantinov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.A. Kozlov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *O. Krebs*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany; *I.N. Lavrik*, Cand. Sci. (Chemistry), Germany; *L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.Yu. Makeev*, Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Russia; *M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *N.A. Provorov*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *D.V. Pyshnyi*, Professor, Dr. Sci. (Chemistry), Russia; *A.V. Ratushny*, Cand. Sci. (Biology), United States; *E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *M.G. Samsonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.A. Stepanov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *M.I. Voevoda*, Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia

**Наследственные особенности
физиологических функций**

- 138 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Регуляция потребления пищи
в период беременности и лактации
у мышей со сниженной активностью
меланокортиновой системы
Е.Н. Макарова, И.В. Романова, Н.М. Бажан
- 145 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние неонатального хэндлинга
на поведение и стресс-ответ у крыс,
селекционируемых по реакции
на человека
*Ю.Э. Гербек, О.А. Амелькина, М.Ю. Коношенко,
С.Г. Шихевич, Р.Г. Гулевич, Р.В. Кожемякина,
И.З. Плюснина, И.Н. Оськина*
- 155 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Экспериментальный описторхоз:
исследование состава форменных
элементов крови, гемопоэза
и стартил-рефлекса у лабораторных
животных
*Д.Ф. Августинovich, И.А. Орловская, Л.Б. Топоркова,
Г.Б. Вишнинецкая, А.В. Катохин, М.Н. Львова,
Е.В. Кашина, Н.П. Бондарь, Н.А. Феофанова,
В.А. Мордвинов*
- 165 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние однократного
введения этанола на поведение,
его потребление и предпочтение
у крыс, селекционируемых
на ручное и агрессивное поведение
по отношению к человеку
*Р.В. Кожемякина, С.Г. Шихевич, А. Каган,
Р.Г. Гулевич*

**Экспрессия ключевых генов
физиологических функций**

- 172 **ОБЗОР**
Влияние космического полета
на экспрессию генов в головном
мозге экспериментальных животных
А.С. Цыбко, Т.В. Ильчибаева, Н.К. Попова
- 180 **ОБЗОР**
5-НТ_{1A} рецептор: роль в регуляции
различных видов поведения
В.С. Науменко, Е.Г. Понимаскин, Н.К. Попова
- 191 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние раннего
провоспалительного стресса
на экспрессию различных
транскриптов *BDNF*
в отделах мозга самцов крыс
препубертатного возраста
*Д.И. Перегуд, С.В. Фрейман, А.О. Тишкина,
Л.С. Сохраняева, Н.А. Лазарева, М.В. Онуфриев,
М.Ю. Степанчиков, Н.В. Гуляева*
- 198 **ОБЗОР**
Глюкокортикоидная гипотеза
депрессии: история и перспективы
Г.Т. Шишкина, Н.Н. Дыгало
- 204 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Функциональное состояние
нигростриатной системы крыс
линии Крушинского – Молодкиной
в ходе аудиогенных судорог
*Н.А. Дорофеева, Л.С. Никитина, Д.В. Зосен,
М.В. Глазова, Е.В. Черниговская*
- 212 **ОБЗОР**
Тирозингидроксилаза мозга
и ее регуляция глюкокортикоидами
*Е.В. Сухарева, Т.С. Калинина, В.В. Булыгина,
Н.Н. Дыгало*

**Генетика функций
гормонов гипоталамуса**

- 220 **ОБЗОР**
Окситоцин: коэволюция человека и одомашнированных животных
Ю.Э. Гербек, Р.Г. Гулевич, Д.В. Шепелева, В.В. Гриневич
- 228 **ОБЗОР**
Естественный и искусственный дефицит вазопрессина: почему последний является летальным?
Д. Зелена
- 234 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние вазопрессина на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма гиалуронана интерстициальной ткани, и на концентрирующую функцию почки крыс WAG
Л.Н. Иванова, А.В. Бабина, Г.С. Батурина, Л.Е. Каткова
- 243 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Особенности роста карциносаркомы Walker 256 у крыс линий Brattleboro и ISIAN (НИСАГ)
И.И. Хегай

**Постгеномные подходы
физиологической генетики**

- 247 **ОБЗОР**
Особенности экспериментального планирования при исследовании транскриптомов методами высокопроизводительного секвенирования
П.Н. Меньшанов, Н.Н. Дыгало
- 255 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Введение оптогенетических векторов в мозг неонатальным животным для исследования функции нейронов в последующие периоды онтогенеза
Д.А. Ланшаков, У.С. Дрозд, Т.А. Запара, Н.Н. Дыгало
- 262 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Серотонин и нейропептид FMRFамид играют противоположную роль в регуляции эпигенетических процессов, вовлеченных в формирование долговременной памяти
Л.Н. Гринкевич, О.В. Воробьева

Hereditary features of physiological functions

- 138 **ORIGINAL ARTICLE**
Food intake regulation during pregnancy and lactation in mice with reduced activity of the melanocortin system
E.N. Makarova, I.V. Romanova, N.M. Bazhan
- 145 **ORIGINAL ARTICLE**
Effects of neonatal handling on behavior and stress-response in rats selected for reaction towards humans
Yu.E. Herbeck, O.A. Amelkina, M.Yu. Konoshenko, S.G. Shikhevich, R.G. Gulevich, R.V. Kozhemyakina, I.Z. Plyusnina, I.N. Oskina
- 155 **ORIGINAL ARTICLE**
Experimental opisthorchiasis: a study of blood cells, hematopoiesis and startle reflex in laboratory animals
D.F. Avgustinovich, I.A. Orlovskaya, L.B. Toporkova, G.B. Vishnivetskaya, A.V. Katokhin, M.N. Lvova, E.V. Kashina, N.P. Bondar, N.A. Feofanova, V.A. Mordvinov
- 165 **ORIGINAL ARTICLE**
Effect of single ethanol administration on behavior and the consumption and preference of ethanol in tame and aggressive rats
R.V. Kozhemyakina, S.G. Shikhevich, A. Cagan, R.G. Gulevich

Expression of genes crucial for physiological functions

- 172 **REVIEW**
The effect of space flight on gene expression in brain
A.S. Tsybko, T.V. Ilchibaeva, N.K. Popova
- 180 **REVIEW**
5-HT_{1A} receptor: its role in the regulation of different kinds of behavior
V.S. Naumenko, E.G. Ponimaskin, N.K. Popova
- 191 **ORIGINAL ARTICLE**
Effects of early neonatal proinflammatory stress on the expression of *BDNF* transcripts in the brain regions of prepubertal male rats
D.I. Peregud, S.V. Freiman, A.O. Tishkina, L.S. Sokhranyeva, N.A. Lazareva, M.V. Onufriev, M.Y. Stepanichev, N.V. Gulyaeva
- 198 **REVIEW**
The glucocorticoid hypothesis of depression: history and perspectives
G.T. Shishkina, N.N. Dygalo
- 204 **ORIGINAL ARTICLE**
Functional state of the nigrostriatal system of Krushinsky – Molodkina rats during audiogenic seizure expression
N.A. Dorofeeva, L.S. Nikitina, D.V. Zosen, M.V. Glazova, E.V. Chernigovskaya
- 212 **REVIEW**
Tyrosine hydroxylase of the brain and its regulation by glucocorticoids
E.V. Sukhareva, T.S. Kalinina, V.V. Bulygina, N.N. Dygalo

Genetics of hypothalamic hormone functions

- 220 **REVIEW**
Oxytocin: co-evolution of human and domesticated animals
Yu.E. Herbeck, R.G. Gulevich, D.V. Shepeleva, V.V. Grinevich
- 228 **REVIEW**
Comparison of natural and artificial vasopressin deficiency: why the latter is lethal?
D. Zelena
- 234 **ORIGINAL ARTICLE**
Effect of vasopressin on the expression of genes for key enzymes of interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys
L.N. Ivanova, A.V. Babina, G.S. Baturina, L.E. Katkova
- 243 **ORIGINAL ARTICLE**
Details of Walker 256 carcinosarcoma growth in Brattleboro and ISIAH lines of rats
I.I. Kheday

Postgenomic approaches in physiological genetics

- 247 **REVIEW**
The design of experiments for the transcriptome studies by high-throughput sequencing methods
P.N. Menshanov, N.N. Dygalo
- 255 **ORIGINAL ARTICLE**
Transfer of optogenetic vectors into the brain of neonatal animals to study neuron functions during subsequent periods of development
D.A. Lanshakov, U.S. Drozd, T.A. Zapara, N.N. Dygalo
- 262 **ORIGINAL ARTICLE**
Opposite roles of serotonin and neuropeptide FMRFamide in the regulation of epigenetic processes involved in the long-term memory formation
L.N. Grinkevich, O.V. Vorobiova

Генетика и физиология многие десятилетия своего развития почти не соприкасались, не взаимодействовали, каждая из них шла своим путем. Генетика занималась наследованием признаков организма, физиология – регуляцией систем, обеспечением гомеостаза и механизмами поведения. В настоящее время совершенно ясно, что организм – единое целое. Вся физиология, стрессорные, гормональные, психоэмоциональные проявления базируются на наследственной основе, но и функции генов, их экспрессия также зависят от нейрогуморальных и других физиологических регуляторов, даже таких как разрядная активность нейронов (см., например, статью Д.А. Ланшакова и др. в этом выпуске). Комплексная наука физиологическая генетика использует физиологические и молекулярно-генетические подходы для идентификации и изучения функции генов, участвующих в реализации физиологических процессов и поведения. Методы физиологической генетики варьируют от биоинформатики, анализа регуляции генов и протеомики до исследования физиологии целого организма. Представленные статьи иллюстрируют некоторые аспекты этой обширной науки результатами, которые получены исследователями Новосибирска, Москвы, Санкт-Петербурга, Будапешта, Берлина, Ганновера и Гейдельберга.

Анализ генетических основ физиологических функций и поведения обычно начинается с выявления наследственного разнообразия по этим признакам и их ответам на внешние воздействия. Этот подход представлен статьями первого раздела выпуска «Наследственные особенности физиологических функций», охватывающими широкий спектр признаков: от регуляции потребления пищи (Е.Н. Макарова и др.), этанола (Р.В. Кожемякина и др.), устойчивости к заражению паразитами (Д.Ф. Августиневич и др.) и вплоть до материнского поведения и нейроэндокринного ответа потомства на стресс (Ю.Э. Гербек, О.А. Амеликина и др.).

Генетико-физиологические механизмы активно выясняют также путем анализа влияния разнообразных факторов на экспрессию генов-кандидатов, потенциальных участников этих механизмов. Важный регулятор функций и поведения – центральная нервная система. Второй раздел выпуска «Экспрессия ключевых генов физиологических функций» представляет изменения экспрессии ряда генов в головном мозге под влиянием факторов, сопряженных с космическим полетом (А.С. Цыбко и др.), аудиогенными судорогами (Н.А. Дорофеева и др.), действием воспалительного стресса (Д.И. Перегуд и др.), глюкокортикоидных гор-

монов стресса (Г.Т. Шишкина и Н.Н. Дыгало; Е.В. Сухарева и др.), а также разнообразных факторов, влияющих на экспрессию и функциональную активность рецептора серотонина (В.С. Науменко и др.).

Ключевую позицию в интеграции нервных и гормональных влияний на разнообразные центральные и периферические процессы в организме занимает гипоталамус. Именно поэтому исследование генетико-физиологических аспектов функции его гормонов, таких как окситоцин и вазопрессин, привлекало и продолжает интересовать ученых. В разделе «Генетика функций гормонов гипоталамуса» дан анализ возможной роли окситоцина в микроэволюционном процессе доместикации диких животных (Ю.Э. Гербек, Р.Г. Гулевич и др.). Кроме того, рассмотрены эффекты экзогенного вазопрессина на систему регуляции водно-электролитного гомеостаза (Л.Н. Иванова и др.), а также последствия генетических нарушений синтеза этого гормона гипоталамуса для канцерогенеза (И.И. Хейгай) и сердечно-сосудистой системы (Д. Зелена).

Установление нуклеотидных последовательностей генов значительного числа видов, в том числе человека и лабораторных животных, дало исследователям новый эффективный «инструментарий». В разделе «Постгеномные подходы физиологической генетики» представлены возможности полногеномного анализа транскриптомов (П.Н. Меньшанов и Н.Н. Дыгало), анализа физиологических последствий эпигенетических модификаций генома (Л.Н. Гринкевич и др.). Сведения о структуре геномов и методы геномной инженерии легли в основу формирования новой области исследования – оптогенетики. Один из первых примеров реализации этого методического подхода в России приведен в статье Д.А. Ланшакова с коллегами.

Важным импульсом развития в нашей стране нового для середины прошлого века и становящегося все более актуальным в постгеномную эру направления медико-биологической науки, физиологической генетики, стало инициированное академиком Дмитрием Константиновичем Беляевым в начале 1970-х годов вхождение нескольких физиологических лабораторий в состав Института цитологии и генетики СО РАН. Первоначальная цель работы этих лабораторий состояла в выяснении механизмов широкомасштабных изменений физиологических функций и поведения, происходящих в ходе одомашнивания диких животных, являющегося, по сути, моделью микроэволюционного процесса. Ключевая роль в этом процессе, согласно Д.К. Беляеву, принадлежит снижению стрессорной нейрогормональной реактивности диких животных в ходе селекции на доместикационный тип поведения в среде, которую создал для них человек. Генетико-физиологические исследования помогли выяснить нейрогормональные аспекты этого процесса, прежде всего, на модели селекции лисиц на доместикационный тип поведения. Именно поэтому ручная лисица по праву представлена на обложке журнала.

*Научный редактор выпуска
член-корреспондент РАН Н.Н. Дыгало*

Регуляция потребления пищи в период беременности и лактации у мышей со сниженной активностью меланокортиновой системы

Е.Н. Макарова¹✉, И.В. Романова², Н.М. Бажан^{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 эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

Активация меланокортиновых рецепторов (МКР) в гипоталамусе подавляет аппетит. Белок, родственник агутти (AgRP), и нейропептид Y (NPY) коэкспрессируются в нейронах гипоталамуса и повышают аппетит: NPY – через свои рецепторы на МКР-нейронах, AgRP связывается с МКР и вызывает их инактивацию. У неразмножающихся мышей генетическая блокада МКР (мутация *yellow* в локусе *agouti* *A^y*) повышает потребление пищи. Остается невыясненной роль МКР в регуляции аппетита в период беременности и лактации, когда потребление пищи значительно возрастает. В этой работе у мышей линии C57Bl/6J *a/a* (контроль) и *A^y/a* генотипов изучали экспрессию AgRP (меланокортиновая регуляция) и NPY (немеланокортиновая регуляция) в гипоталамусе в период беременности (7, 13, 18-й дни) и лактации (10-й и 21-й дни) и сопоставили ее с потреблением пищи. У виргинных *A^y/a* (блокада МКР) самок по сравнению с *a/a* самками потребление пищи было повышено, уровень мРНК и иммунореактивность AgRP понижены. Динамика возрастания потребления пищи по ходу беременности различалась у *A^y/a* и *a/a* мышей. Уровень мРНК NPY возрастал только у *a/a* самок, а уровень мРНК AgRP – у самок обоих генотипов, но у *A^y/a* был ниже, чем у контрольных. После родов потребление пищи, уровни мРНК нейропептидов и иммунореактивность AgRP в гипоталамусе не различались у *A^y/a* и *a/a* самок, экспрессия AgRP у лактирующих *A^y/a* самок была выше, чем у виргинных. Полученные результаты показывают, что блокада МКР снижает экспрессию AgRP у неразмножающихся самок мышей, беременность уменьшает, а лактация устраняет этот эффект. Повышение потребления пищи во время беременности связано с активацией синтеза NPY и AgRP и проведением орексигенного сигнала через МКР. Гиперфагия лактации не зависит от инактивации МКР-рецепторов.

Ключевые слова: *A^y* мыши; потребление пищи; беременность; лактация; меланокортиновые рецепторы; NPY; AgRP.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Макарова Е.Н., Романова И.В., Бажан Н.М. Регуляция потребления пищи в период беременности и лактации у мышей со сниженной активностью меланокортиновой системы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):138-144. DOI 10.18699/VJ16.124

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Makarova E.N., Romanova I.V., Bazhan N.M. Food intake regulation during pregnancy and lactation in mice with reduced activity of the melanocortin system. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):138-144. DOI 10.18699/VJ16.124

ORIGINAL ARTICLE

Received 15.10.2015 г.

Accepted for publication 30.11.2015 г.

© AUTHORS, 2016

Food intake regulation during pregnancy and lactation in mice with reduced activity of the melanocortin system

E.N. Makarova¹✉, I.V. Romanova², N.M. Bazhan^{1, 3}

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

² I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Hypothalamic melanocortin receptor (MCR) activation inhibits appetite. Neuropeptide Y (NPY) and Agouti Related Protein (AgRP) are coexpressed in some hypothalamic neurons and stimulate feeding, NPY via inhibition of MCR-expressing neurons, and AgRP via MCR4 antagonism. Mutation *yellow* at the mouse *agouti* locus (*A^y*) evokes MCR blockage and stimulates appetite in nulliparous females. The role of MCRs in food intake regulation during pregnancy and lactation is unclear. In this study we measured hypothalamic AgRP and NPY mRNA levels in virgin and mated C57Bl/6J *a/a* (control) and *A^y/a* females on days 7, 13, 18 of pregnancy, 10, 21 of lactation, and after offspring separation, AgRP immunoreactivity in virgin and lactating females, and correlated gene expression with food intake (FI). Virgin *A^y/a* compared to *a/a* females had higher FI and lower AgRP expression. Pregnant *A^y/a* and *a/a* mice showed different patterns of food intake and neuropeptide expressions. NPY mRNA levels increased during pregnancy only in *a/a* mice, while AgRP mRNA levels increased in both genotypes being lower in *A^y/a* than in *a/a* mice. In lactating *A^y/a* and *a/a* mice, AgRP expression and NPY mRNA level were similar. AgRP expression was higher in lactating than in virgin *A^y/a* mice. The results obtained demonstrate that in non-breeding female mice, MCR blockage is associated with AgRP expression inhibition which vanishes in lactation. In lactation, hyperphagia is independent of MCR blockage. In pregnancy, food intake regulation involves MCR signaling and activation of NPY and AgRP expression.

Key words: *A^y* mice; food intake; pregnancy; lactation; melanocortin receptors; NPY; AgRP.

Исследования механизмов поддержания энергетического гомеостаза приобрели особую актуальность в связи с широким распространением метаболических заболеваний, таких как ожирение и диабет. Как правило, ожирение развивается на фоне повышенного потребления пищи (гиперфагия) и сниженного расхода энергии (Konturek et al., 2005). Беременность и особенно лактация характеризуются выраженной гиперфагией, что может служить фактором, провоцирующим развитие ожирения. В период лактации потребление пищи возрастает в несколько раз по сравнению с нормой (Makarova et al., 2010). Регуляторные механизмы повышения аппетита у беременных и кормящих самок изучены недостаточно (Woodside et al., 2012). Исследования в этой области направлены в основном на изучение функции меланокортиновой системы.

Меланокортиновая система мозга считается одной из основных (если не основной) системой, задействованной в регуляции потребления и расхода энергии (Mountjoy, 2015). Она включает в себя нейроны, экспрессирующие меланокортиновые рецепторы 3-го и 4-го типа (МКР3, МКР4), представленные в различных областях мозга (Mountjoy et al., 1994), а также две субпопуляции нейронов, локализованные в аркуатном ядре гипоталамуса (АРК), которые секретируют лиганды этих рецепторов. Одна субпопуляция нейронов синтезирует меланоцитстимулирующий гормон (МСГ), предшественником которого является проопиомеланокортин (ПОМК), другая – белок, родственник агуты (Agouti gene Related Protein, AgRP), и нейропептид Y (NPY). МСГ и AgRP конкурируют за связывание с МКР и оказывают противоположное действие на баланс энергии: связывание МСГ с МКР4 активирует нейрональные пути, приводящие к снижению потребления пищи и увеличению расхода энергии, тогда как связывание AgRP с этим рецептором, напротив, увеличивает потребление пищи и снижает расход энергии (Mountjoy, 2015). NPY через собственные рецепторы ингибирует МКР4-экспрессирующие нейроны, что также увеличивает аппетит (Sternson, Atasoy, 2014).

Показано, что у кормящих самок крыс (Mann et al., 1997; Suzuki et al., 2014) снижена экспрессия ПОМК и повышена экспрессия AgRP и NPY в нейронах гипоталамуса, что, по мнению авторов, и вызывает гиперфагию, поскольку это приводит к инактивации МКР и повышению аппетита. Однако генетическая блокада МКР, которую вызывает мутация *yellow* в локусе *aguti* (A^y) у мышей, не оказывает влияния на потребление пищи в период лактации (Makarova et al., 2010). Это говорит о том, что у лактирующих самок повышение аппетита не связано с проведением сигнала через МКР.

Оптогенетические исследования меланокортиновой системы продемонстрировали, что снижение потребления пищи, вызванное фотостимуляцией ПОМК нейронов, связано с проведением сигнала через МКР, тогда как увеличение в потреблении пищи, вызванное фотостимуляцией AgRP/NPY-синтезирующих нейронов, не зависит от меланокортиновых рецепторов (Aronite et al., 2011). Возможно, отсутствие влияния генетической блокады МКР на потребление пищи в период лактации связано с независимой от МКР активностью AgRP/NPY нейронов гипоталамуса.

Целью настоящей работы было изучение гипоталамической экспрессии AgRP и NPY и сопоставление ее с потреблением пищи у мышей с мутацией A^y в период беременности и лактации.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились в соответствии с российскими (Приказ МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных») и Международными европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС) по содержанию и обращению с лабораторными животными.

В работе использовали мышей линии C57Bl/6J, несущих мутацию *yellow* в локусе *aguti* (A^y/a генотип) из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Контролем служили мыши стандартного линейного *aguti* генотипа (a/a) этой линии. Животных кормили гранулированным кормом для конвенционального содержания и разведения (ЗАО «Ассортимент – Агро», Москва, Сергиев Посад, Россия), содержали при режиме освещения 12 ч свет : 12 ч темнота и свободном доступе к воде и пище.

Потребление пищи. Самок в возрасте 8–9 нед спаривали с самцами, покрытие регистрировали по вагинальной пробке, день обнаружения пробки считали нулевым днем беременности. Покрытых самок содержали поодиночке и ежедневно измеряли потребление пищи в течение всей беременности и первых десяти дней после родов. Детенышей отсаживали в возрасте 4 нед, у самок после отсадки детенышей измеряли недельное потребление пищи в течение 3 нед.

Измерение уровня мРНК AgRP и NPY и иммунореактивности AgRP в гипоталамусе. Покрытых самок умерщвляли декапитацией на 7-, 13-, 18-й дни беременности, 10- и 21-й дни после родов и через три недели после отсадки детенышей. Извлекали гипоталамусы и помещали в жидкий азот. Для сравнения использовали виргинных самок в возрасте 8–10 нед. В каждую контрольную или экспериментальную группу входило не менее шести особей.

Уровень мРНК NPY и AgRP оценивали методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) как отношение количества мРНК исследуемого гена к количеству мРНК β -актина мыши.

Проведение ОТ-ПЦР. Из гипоталамуса выделяли общую РНК, используя TRI reagent (Sigma, США), согласно инструкции. Для обратной транскрипции использовали M-MuLV обратную транскриптазу (НПО «СибЭнзим») и олиго-dT в качестве праймера, в пробу вносили один мкг общей РНК.

С помощью электрофореза в агарозном геле оценивали количество амплифицированных фрагментов кДНК NPY и AgRP по отношению к фрагменту мышиного β -актина. Электрофорез продуктов ПЦР для обоих нейропептидов и β -актина проводили в одном геле в стандартных условиях, окрашивали гели бромистым этидием, детекцию свечения в УФ проводили в стандартных условиях, для оценки оптической плотности бэндов использовали про-

грамму GelPro. Для каждого образца РНК проводили по две реакции обратной транскрипции, для каждого образца кДНК – по две ПЦР, в результате чего значение экспрессии для каждой особи рассчитывалось как среднее из четырех. В качестве праймеров для ПЦР использовали для NPY смысловой 5'-tggttggtgacattctggctgagg-3', антисмысловой 5'-ttctggggcggtttctgtgct-3' (Shimokawa et al., 2002); для AgRP – смысловой 5'-gaaggcctgaccaggctctgttcc-3', антисмысловой 5'-tttgatgtcacgcacgatttccc-3'; для β -актина – смысловой 5'-gtgggcccgccttaggcaccag-3', антисмысловой 5'-ctcttgatgtcacgcacgatttcc-3' (Ziotopoulou et al., 2000).

Уровень AgRP в аркуатном (АРК) и паравентрикулярном (ПВЯ) ядрах гипоталамуса у лактирующих самок (с 7-го по 14-й дни лактации) и у виргинных самок (соответствующего возраста) оценивали с помощью иммуногистохимии. В каждую экспериментальную группу вошло по пять самок. Животные были подвергнуты острому эфирному наркозу и перфузированы транскардиально 0,1 М фосфатным буфером и 4 %-м параформальдегидом. Этапы обработки материала для иммуногистохимического исследования были описаны ранее (Mikhrina, Romanova, 2015). Исследования проведены на фронтальных свободно плавающих срезах мозга толщиной 20 мкм, приготовленных с помощью криостата (Leika, Германия). Каждый десятый срез был окрашен толлуидиновым синим для идентификации паравентрикулярного и аркуатного ядер гипоталамуса, согласно атласу мозга мыши (Paxinos, Franklin, 2001).

Для выявления AgRP-иммунопозитивных структур был использован каждый четвертый срез гипоталамуса. После предварительной обработки и блокировки эндогенной пероксидазы в растворе 0,3 %-й перекиси водорода, разведенной на 100 %-м метаноле, срезы инкубировали 48 ч при +4 °C с антителами кролика к AGRP 83-132 (Phoenix Inc., CA, США) в разведении 1 : 1000. Затем были использованы вторичные антитела козы против кролика, конъюгированные с биотином (VectorLab., США, 1 : 300) и комплекс стрептавидин-пероксидаза (Sigma, США, 1 : 1000).

Визуализацию реакции проводили 0,05 %-м диаминобензидином с 0,015 %-й перекисью водорода. Срезы натягивали на стекла, покрытые желатином, высушивали при комнатной температуре и после стандартной гистологической обработки заключали под покровное стекло с помощью прозрачной среды Bio-maunt (Bio-Optica, Италия). Для проверки специфичности антител были проведены негативные контроли (реакции без первых или вторых антител).

Изображения структур на препаратах мозга были получены с помощью микроскопа Zeiss (Imager A1, Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8. На снимках с помощью программы Scion Imager (NIH, 4.1) была определена оптическая плотность (ОП) иммунореактивного вещества (на 1 мкм²).

Статистическая обработка. Для оценки влияния сроков беременности или лактации на потребление пищи использовали двухфакторный дисперсионный анализ (2-way ANOVA) с градациями факторов «генотип самки (*a/a*, *A^y/a*)» и «день беременности» или «день лактации». Для оценки различий в потреблении пищи между *a/a* и *A^y/a*

самками после отъема детенышей использовали критерий Стьюдента для каждой недели. Для оценки влияния срока беременности и лактации на уровень мРНК нейропептидов использовали однофакторный дисперсионный анализ (1-way ANOVA) для каждого генотипа в отдельности и двухфакторный дисперсионный анализ с градациями факторов «генотип самки» и «срок беременности (0, 7, 13, 18) или лактации (10, 21)» с последующей оценкой межгрупповых различий с помощью апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan). Для оценки влияния лактации на иммунореактивность AgRP в ядрах гипоталамуса использовали двухфакторный дисперсионный анализ с градациями факторов «генотип самки» и «репродуктивный статус (виргинные, лактация)». Результаты представлены в виде значений среднего $\pm$ ошибка среднего. Для оценки межгрупповых различий в случае необходимости использовали критерий Стьюдента.

Результаты

Потребление пищи. До спаривания *A^y/a* самки потребляли больше пищи, чем *a/a* самки ($3,1 \pm 0,1$ г/день, $n = 9$, $3,6 \pm 0,1$ г/день, $n = 9$, *a/a* и *A^y/a* соответственно, $p < 0,01$, тест Стьюдента). Достоверные различия по потреблению пищи сохранялись в первые три дня после покрытия (рис. 1).

Хотя самки обоих генотипов демонстрировали возрастание в потреблении пищи по ходу беременности, динамика этого возрастания у них различалась, о чем свидетельствует достоверное взаимодействие факторов генотип $\times$ день беременности ($p < 0,01$, 2-way ANOVA), (рис. 1). Вплоть до седьмого дня беременности *A^y/a* самки потребляли больше пищи, чем *a/a* самки, а в период с 11-го по 15-й дни беременности – меньше. Во время лактации, когда потребление пищи было максимальным, а также в течение первой недели после отъема детенышей *A^y/a* и *a/a* самки съедали одинаковое количество корма, но со второй недели после отъема детенышей, *A^y/a* самки начинали потреблять больше пищи (рис. 1). Таким образом, гиперфагия, вызванная блокадой меланокортиновых рецепторов, наблюдалась только у небеременных и нелактирующих самок либо на начальных стадиях беременности.

Уровень мРНК нейропептидов. У небеременных *A^y/a* и *a/a* самок в возрасте спаривания (8–9 нед) уровень мРНК NPY не различался, а уровень мРНК AgRP был вдвое ниже у *A^y/a* самок (рис. 2).

Профиль экспрессии NPY и AgRP менялся в ходе репродуктивного процесса и зависел от *агути* генотипа самок. У *a/a* мышей уровень мРНК нейропептидов возрастал во время беременности и снижался после родов (рис. 2, 1-way ANOVA, $F_{5,36} = 4,6$, $p < 0,01$ для NPY; $F_{5,35} = 3,9$, $p < 0,01$ для AgRP). При этом уровень мРНК NPY прогрессивно возрастал до 13-го дня беременности и затем не менялся до конца беременности (рис. 2). Уровень мРНК AgRP достоверно увеличивался по сравнению с контролем и предшествующим периодом только на 18-й день беременности (рис. 2). На 10-й день лактации уровень мРНК NPY был снижен по сравнению с 13-м и 18-м днями беременности, мРНК AgRP – по сравнению с 18-м днем беременности. Уровень мРНК обоих нейропептидов на 10-й и 21-й дни

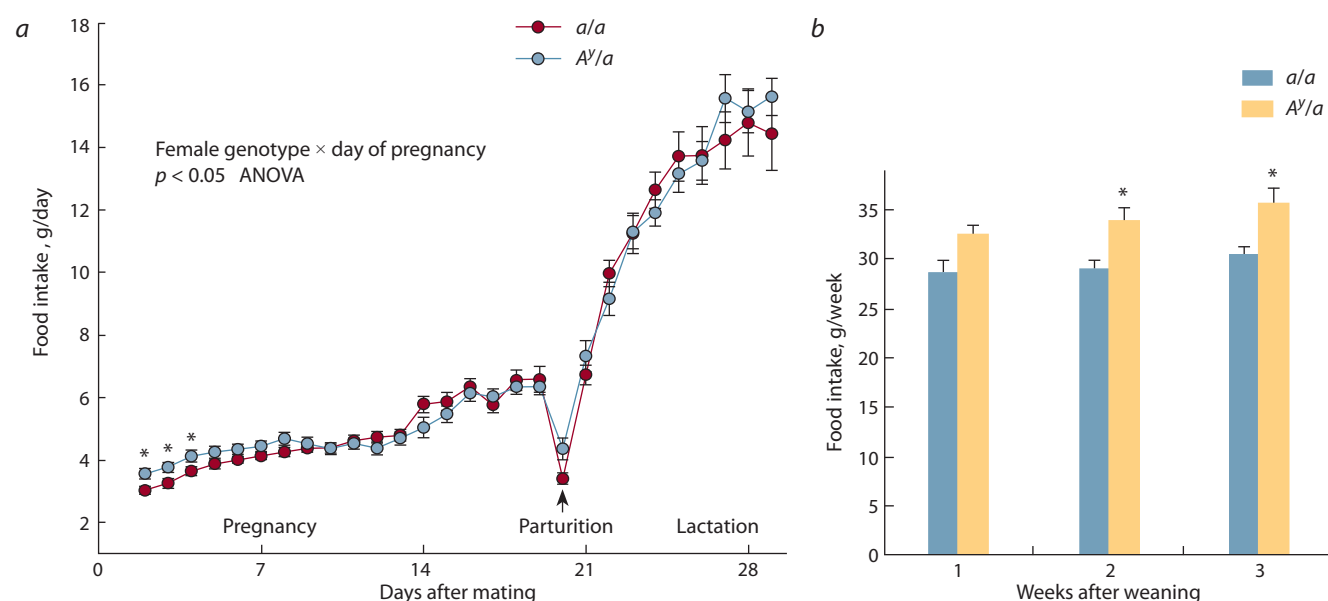


Fig. 1. Food intake by *a/a* and *A^y/a* female mice: (a) daily food intake (g/day) during pregnancy and 10 days of lactation; (b) weekly food intake (g/week) during 3 weeks after weaning.

Data are presented as means $\pm$ SE. * $p < 0.01$, Student's *t*-test, *a/a* vs. *A^y/a*.

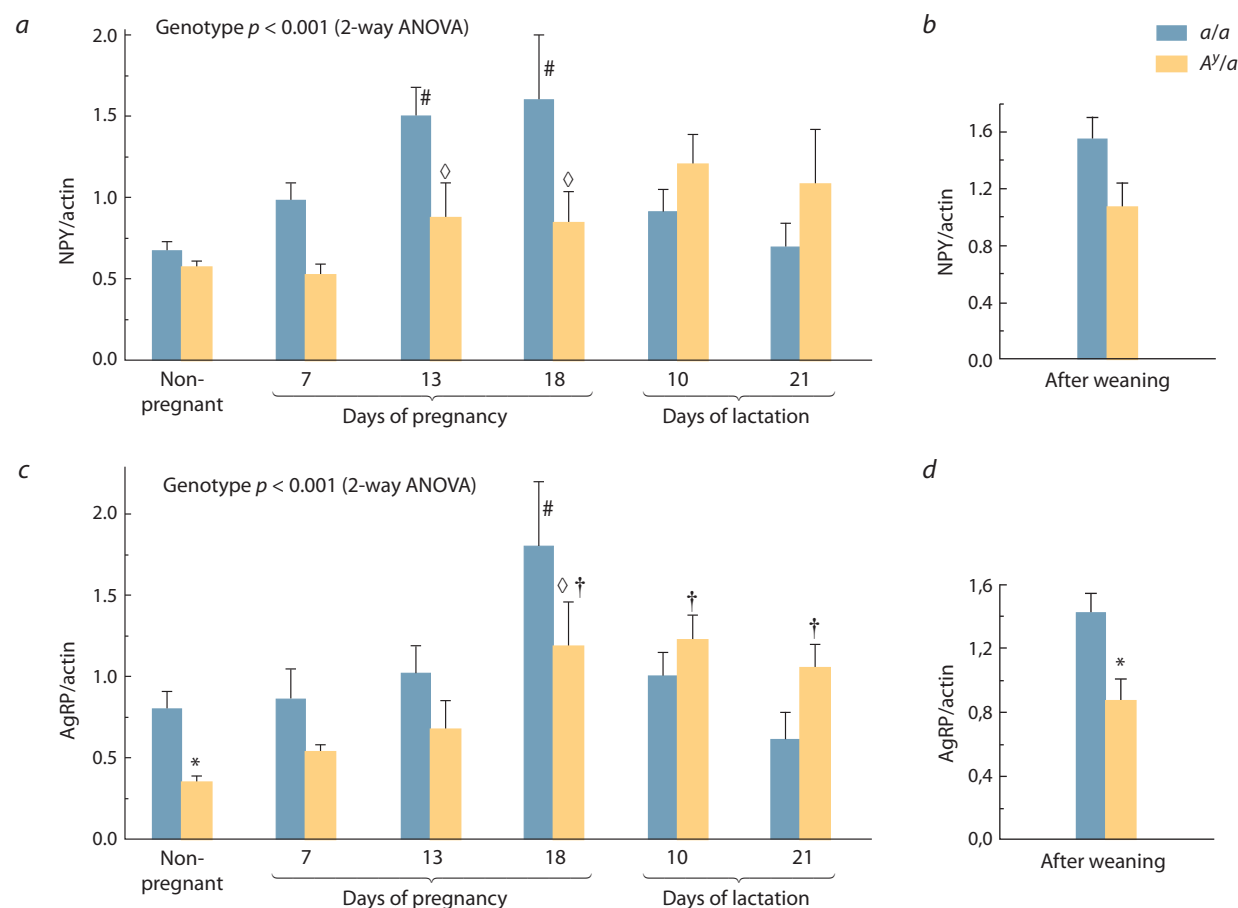


Fig. 2. Levels of (a, b) NPY and (c, d) AgRP mRNA in *a/a* and *A^y/a* female mice: (a, c) during pregnancy and lactation; (b, d) after weaning.

The X-axis shows days of pregnancy (p.d) and days of lactation. The Y-axis shows relative gene expression (arbitrary units) calculated as cDNA signals of NPY or AgRP normalized to β -actin cDNA signals. Data are presented as means $\pm$ SE. * $p < 0.05$, Student's *t*-test, *a/a* vs. *A^y/a*; # $p < 0.05$, post-hoc Duncan, *a/a* vs. *A^y/a*; $\diamond$ $p < 0.05$, post-hoc Duncan, between day 13 or 18 of pregnancy and other indicated points for *a/a* female mice (a, c); $\dagger$ $p < 0.05$, post-hoc Duncan, between day 10 or 21 of lactation and nonpregnant females for *A^y/a* mice (c).

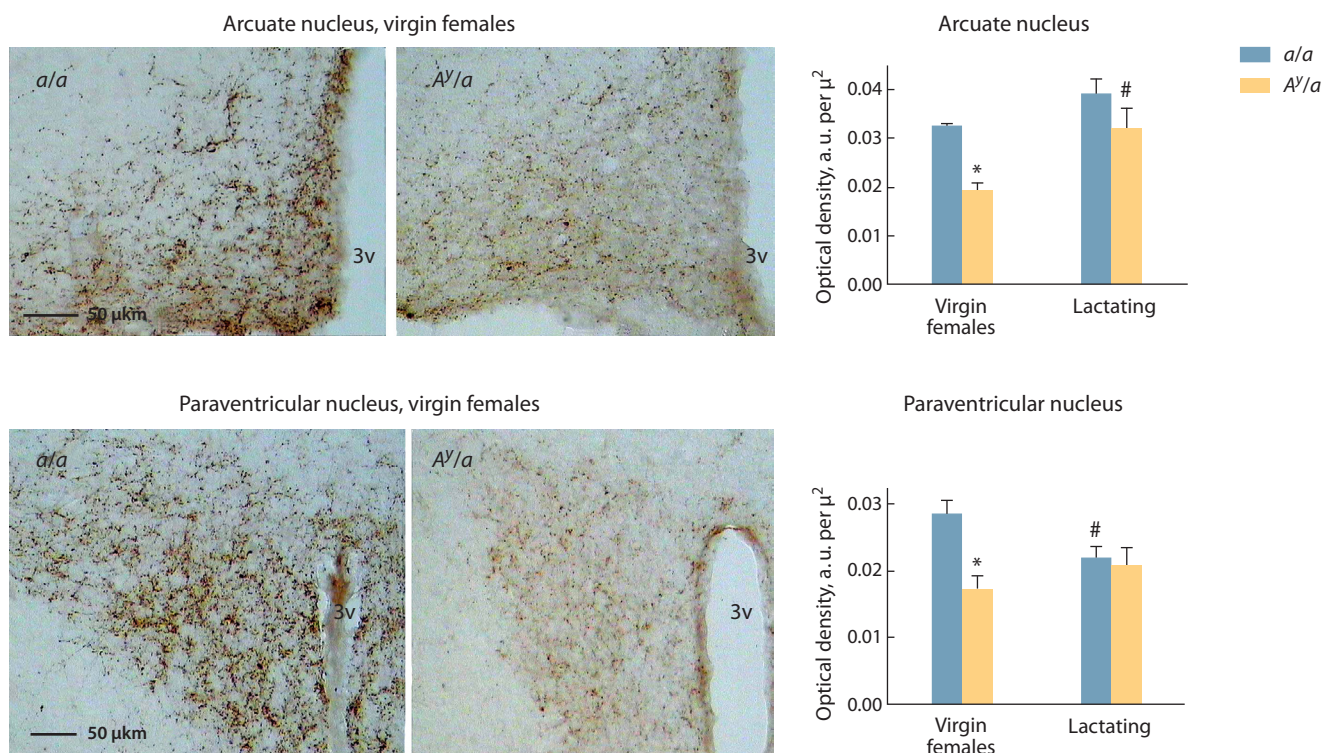


Fig. 3. AgRP immunoreactivity in hypothalamic arcuate and paraventricular nuclei in virgin and lactating *a/a* and *A^y/a* female mice.

The Y axis represents relative optical density in arbitrary units per μ^2 . Data are presented as $M \pm SE$. * $p < 0.05$, post-hoc Duncan, *a/a* vs. *A^y/a*; # $p < 0.05$, post-hoc Duncan, virgin vs. lactating females for *A^y/a* mice in the arcuate nucleus and for *a/a* mice in the paraventricular nucleus.

лактации не имел достоверных различий с таковым у небеременных самок.

У *A^y/a* мышей однофакторный дисперсионный анализ не выявил влияния беременности и лактации на уровень мРНК NPY. Уровень мРНК AgRP возрастал по ходу беременности и затем не менялся (1-way ANOVA, $F_{5,38} = 3,8$, $p < 0,01$). У лактирующих *A^y/a* мышей уровень мРНК AgRP был выше, чем у небеременных самок (рис. 2).

Уровень мРНК NPY у *A^y/a* мышей по сравнению с *a/a* мышами был снижен в период беременности и не различался в период лактации, после отъема детенышей и у небеременных самок (рис. 2). Уровень мРНК AgRP у *A^y/a* мышей по сравнению с *a/a* мышами был снижен в период беременности, после отъема детенышей и у небеременных самок и не различался только в период лактации (рис. 2).

Анализ содержания AgRP в ядрах гипоталамуса. Иммуногистохимическое выявление AgRP на срезах гипоталамуса показало, что в АРК уровень белка зависел как от *агути* генотипа самок ($p < 0,01$, $F_{1,16} = 13$, 2-way ANOVA), так и от их репродуктивного статуса ($p < 0,01$, $F_{1,16} = 11$, 2-way ANOVA). При этом достоверные генотипические отличия наблюдались только у небеременных самок: у *A^y/a* мышей уровень белка был снижен по сравнению с *a/a* мышами на 40 % ($p < 0,05$), (рис. 3).

Уровень белка возрастал у лактирующих самок обоих генотипов по сравнению с виргинными, но различия достигали статистической значимости только у *A^y/a* мышей,

у которых уровень белка возрастал на 66 % ($p < 0,05$), (рис. 3).

В ПВЯ, как и в АРК, уровень AgRP зависел от *агути* генотипа самок ($p < 0,01$, $F_{1,16} = 8,64$, 2-way ANOVA), кроме того, было выявлено достоверное взаимодействие факторов генотипа и репродуктивного статуса ($p < 0,05$, $F_{1,16} = 5,58$, 2-way ANOVA). Как и в АРК, в ПВЯ статистически достоверные генотипические различия были обнаружены только у виргинных самок (у *A^y/a* на 39 % ниже, чем у *a/a*, $p < 0,05$), (рис. 3). Однако, в отличие от АРК, в ПВЯ уровень AgRP у лактирующих *a/a* самок достоверно снизился по сравнению с виргинными, а у *A^y/a* самок несколько возрос, хотя различия между виргинными и лактирующими самками не достигли статистической значимости.

Таким образом, в обоих ядрах представительство AgRP было снижено у виргинных самок *A^y/a* генотипа по сравнению с *a/a* генотипом. Во время лактации эти различия в обоих ядрах исчезали, но по разным причинам: в аркуатном ядре в основном за счет повышения уровня AgRP у *A^y/a* мышей, а в паравентрикулярном ядре главным образом за счет снижения уровня AgRP у *a/a* мышей (рис. 3).

Обсуждение

Мы проследили за изменением потребления пищи и гипоталамической экспрессией орексигенных нейропептидов

NPY и AgRP в ходе беременности, лактации и после отъема детенышей у самок с нормальной функцией меланокортиновой системы и блокадой МКР.

Прежде всего, было обнаружено, что у *A^{y/a}* самок в периоды, не связанные с увеличением энергозатрат на размножение (виргинные и после отъема детенышей), потребление пищи было повышено (из-за блокады МКР) (Miltnerberger et al., 1997), а экспрессия AgRP понижена по сравнению с *a/a* контролем, что совпадает с результатами, полученными ранее на самцах *A^{y/a}* мышей (Tsutsumi et al., 2002). Количество самого белка как в АРК, где он синтезируется, так и в ПВЯ, куда транспортируются гранулы с нейропептидами, также было снижено. Эти результаты свидетельствуют о том, что генетическая блокада меланокортиновых рецепторов приводит к компенсаторному снижению активности AgRP/NPY продуцирующих нейронов. Однако мы, как и другие авторы ранее (Kesterson et al., 1997), не обнаружили разницы по экспрессии мРНК NPY в гипоталамусе у виргинных *a/a* и *A^{y/a}* самок, что позволяет высказать предположение о возможности специфического подавления синтеза AgRP в AgRP/NPY-продуцирующих нейронах у *A^{y/a}* мышей. Опто- и фармакогенетические исследования показали, что секретируемые AgRP-позитивными нейронами медиаторы (AgRP, NPY и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК)) различаются по характеру своего воздействия на аппетит (Sternson, Atasoy, 2014). AgRP через МКР4 оказывает долгосрочное активирующее влияние на потребление пищи, а NPY и ГАМК через собственные рецепторы повышают потребление пищи непосредственно после активации нейронов, при этом каждый из медиаторов способен заместить действие двух остальных при генетическом нокауте последних (Krashes et al., 2013). Возможно, каждый медиатор имеет собственные пути внутриклеточной регуляции синтеза и деградации.

Сопоставление профилей экспрессии NPY и AgRP с потреблением пищи у нормальных (*a/a*) самок в ходе репродуктивного процесса показывает, что на начальных этапах беременности гиперфагия ассоциирована с ростом уровня мРНК NPY, в конце беременности – с повышенным уровнем мРНК обоих нейропептидов. Возможно, в первой половине беременности аппетит повышается за счет преимущественного действия NPY, которое во второй половине беременности усиливается связыванием AgRP с МКР4. Вовлеченность AgRP нейронов и меланокортиновых рецепторов в регуляцию аппетита в период беременности подтверждается и тем, что у *A^{y/a}* самок прирост в потреблении пищи по ходу беременности был менее выражен, чем у *a/a* самок, при этом у них была снижена экспрессия NPY и AgRP в течение всей беременности.

В период лактации меланокортиновая система уступает ведущую роль в регуляции энергетического гомеостаза другим, пока еще мало исследованным регуляторным механизмам. Об этом свидетельствуют снижение уровня мРНК NPY и AgRP у родивших *a/a* самок до значений, присущих виргинным самкам, а также отсутствие разницы в потреблении пищи у лактирующих *A^{y/a}* и *a/a* мышей. Стимуляция аппетита во время лактации может зависеть от немеланокортиновых сигнальных путей, которые активируются AgRP-нейронами через ГАМК, о чем свиде-

тельствуют результаты, представленные Phillips и Palmiter (2008). Авторы показали, что специфическое разрушение AgRP-нейронов на седьмой и девятый дни после родов как у нормальных мышей, так и у мышей с двойным нокаутом по генам *npy* и *agrp* приводило к резкому уменьшению в потреблении пищи. Современные исследования функции AgRP-нейронов показали, что их орексигенное действие опосредуется через взаимодействие AgRP с МКР4 в ядрах гипоталамуса и через МКР независимые пути в других структурах мозга (Wu, Palmiter, 2011). Снижение иммунореактивности AgRP в ПВЯ гипоталамуса у лактирующих *a/a* самок по сравнению с виргинными говорит о возможном перераспределении активности AgRP нейронов в пользу МКР-независимых сигнальных путей.

Изменение экспрессии мРНК AgRP у *A^{y/a}* мышей в процессе беременности, лактации и после отъема детенышей и отсутствие отличий как по уровню мРНК, так и по иммунореактивности белка в АРК во время лактации, говорят о том, что ингибирующее действие блокады МКР на экспрессию AgRP снимается в ходе репродуктивного процесса и вновь восстанавливается после его окончания. Активация синтеза AgRP в конце беременности как у *a/a*, так и у *A^{y/a}* самок может происходить под действием метаболических стимулов (например, снижения концентраций глюкозы в ходе беременности (Makarova et al., 2010) либо специфичных для беременности гормональных сигналов; в период лактации – под действием факторов, связанных с синтезом, сосанием и отдачей молока. Однако остается неизвестным, какие именно метаболические и гормональные сигналы влияют на активность AgRP-нейронов у беременных и кормящих самок (Woodside et al., 2012).

Неясно, имеет ли влияние на потребление пищи в период беременности и лактации изменение экспрессии AgRP у мышей с генетической блокадой меланокортиновых рецепторов, поскольку наличие МКР4 необходимо и достаточно для реализации орексигенного действия AgRP (Krashes et al., 2013). Нельзя исключить другие, непрямые, пути регуляторного влияния AgRP на аппетит, например, через влияние на активность других нейромедиаторов в AgRP-нейронах. О возможности таких взаимовлияний свидетельствуют эксперименты, которые показали, что нокаут гена *npy* не влияет на потребление пищи при активации AgRP-нейронов, но сопровождается при этом значительной интенсификацией передачи сигнала через ГАМК (Sternson, Atasoy, 2014).

Представленные в данной работе результаты указывают на возможную вовлеченность AgRP-нейронов гипоталамуса в не связанную с передачей сигнала через МКР регуляцию потребления пищи в период беременности и лактации, что не исключает и других путей регуляции. Стимулирующий эффект на аппетит в период беременности может оказывать возрастание уровня глюкокортикоидов по ходу беременности (Makarova et al., 2010), поскольку кортикотропин-релизинг фактор (КРФ) снижает аппетит (Drescher et al., 1994), а глюкокортикоиды по системе отрицательной обратной связи подавляют экспрессию КРФ в гипоталамусе (Brunton et al., 2008; da Costa et al., 2001). В период лактации значительное влияние на потребление пищи могут оказывать пролактин

и сосательные стимулы (Woodside et al., 2012). Регуляция энергетического гомеостаза в период беременности и лактации требует дальнейшего изучения с привлечением современных генетических и физиологических методов исследования.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что блокада меланокортиновых рецепторов оказывает ингибирующее влияние на экспрессию AgRP в аркуатном ядре гипоталамуса, но только у самок, не вовлеченных в репродуктивный процесс: во время беременности это ингибирующее влияние ослабевает и полностью исчезает при лактации. Регуляция потребления пищи различается у беременных и лактирующих самок. Регуляторные механизмы, повышающие потребление пищи в период беременности, включают в себя активацию синтеза NPY и AgRP в APK и проведение орексигенного сигнала через МКР. Ведущую роль в регуляции потребления пищи во время лактации берут на себя сигнальные пути, не связанные с функционированием меланокортиновых рецепторов.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004 and the Russian Foundation for Basic Research, projects 06-04-48517 and 07-04-01258.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aponte Y., Atasoy D., Sternson S.M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 2011;14(3):351-355. DOI 10.1038/nn.2739
- da Costa A.P., Ma X., Ingram C.D., Lightman S.L., Aguilera G. Hypothalamic and amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH receptor-1 mRNA expression in the stress-hyporesponsive late pregnant and early lactating rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2001;91:119-130.
- Drescher V.S., Chen H.L., Romsos D.R. Corticotropin-releasing hormone decreases feeding, oxygen consumption and activity of genetically obese (ob/ob) and lean mice. *J. Nutr.* 1994;124:524-530.
- Kesterson R.A., Huszar D., Lynch C.A., Simerly R.B., Cone R.D. Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome. *Mol. Endocrinol.* 1997;11(5):630-637.
- Konturek P.C., Konturek J.W., Cześnikiewicz-Guzik M., Brzozowski T., Sito E., Konturek S.J. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005;56(Suppl. 6):5-25.
- Krashes M.J., Shah B.P., Koda S., Lowell B.B. Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab.* 2013;18(4):588-595. DOI 10.1016/j.cmet.2013.09.009
- Makarova E.N., Yakovleva T.V., Shevchenko A.Y., Bazhan N.M. Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in A^y/a mice. *Acta Physiol. (Oxf).* 2010;198(2):169-177. DOI 10.1111/j.1748-1716.2009.02046.x
- Mann P.E., Rubin B.S., Bridges R.S. Differential proopiomelanocortin gene expression in the medial basal hypothalamus of rats during pregnancy and lactation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997;46(1/2):9-16.
- Mikhrina A.L., Romanova I.V. The role of AGRP in regulating dopaminergic neurons in the brain. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2015;45(5):536-541.
- Miltenberger R.J., Mynatt R.L., Wilkinson J.E., Woychik R.P. The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome. *J. Nutr.* 1997;127:1902S-1907S.
- Mountjoy K.G. Pro-opiomelanocortin (POMC) neurones, POMC-derived peptides, melanocortin receptors and obesity: how understanding of this system has changed over the last decade. *J. Neuroendocrinol.* 2015;27(6):406-418. DOI 10.1111/jne.12285
- Mountjoy K.G., Mortrud M.T., Low M.J., Simerly R.B., Cone R.D. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 1994;8(10):1298-1308.
- Paxinos G.T., Franklin K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Acad. Press, 2001.
- Phillips C.T., Palmiter R.D. Role of agouti-related protein-expressing neurons in lactation. *Endocrinology*. 2008;149(2):544-550.
- Shimokawa T., Kumar M.V., Lane M.D. Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002;99(1):66-71.
- Sternson S.M., Atasoy D. Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2/3):95-102. DOI 10.1159/000369072
- Suzuki Y., Nakahara K., Maruyama K., Okame R., Ensho T., Inoue Y., Murakami N. Changes in mRNA expression of arcuate nucleus appetite-regulating peptides during lactation in rats. *J. Mol. Endocrinol.* 2014;52(2):97-109. DOI 10.1530/JME-13-0015
- Tsuruta Y., Yoshimatsu H., Hidaka S., Kondou S., Okamoto K., Sakata T. Hyperleptinemia in A^y/a mice upregulates arcuate cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002;282(4):E967-973.
- Woodside B., Budin R., Wellman M.K., Abizaid A. Many mouths to feed: the control of food intake during lactation. *Front. Neuroendocrinol.* 2012;33(3):301-314. DOI 10.1016/j.yfrne.2012.09.002
- Wu Q., Palmiter R.D. GABAergic signaling by AgRP neurons prevents anorexia via a melanocortin-independent mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 660(1):21-27. DOI 10.1016/j.ejphar.2010.10.110
- Ziotopoulou M., Mantzoros C.S., Hileman S.M., Flier J.S. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 279(4):E838-E845.



Влияние неонатального хэндлинга на поведение и стресс-ответ у крыс, селекционируемых по реакции на человека

Ю.Э. Гербек¹✉, О.А. Амелькина^{1, 2, 3}, М.Ю. Коношенко¹, С.Г. Шихевич¹, Р.Г. Гулевич¹, Р.В. Кожемякина¹, И.З. Плюснина¹, И.Н. Оськина¹

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

³ Институт исследования животных в зоопарках и в природе Общества им. Лейбница, Отдел репродуктивной биологии, Берлин, Германия

Известно, что неонатальный хэндлинг может приводить к устойчивым изменениям нейробиологического и поведенческого фенотипов. Под влиянием неонатального хэндлинга у крыс, селекционированных на усиление агрессивно-оборонительной реакции по отношению к человеку («агрессивные», 44-е поколение), происходило значительное ослабление агрессии, сопровождаемое снижением стресс-реактивности. Однако и у интактных агрессивных крыс последних поколений (70-е) отмечали более низкий стрессорный уровень кортикостерона относительно 44-го поколения, который не так существенно отличался от соответствующего уровня гормона у «ручных» крыс, селекционируемых в противоположном направлении – на отсутствие агрессии к человеку. Исследование проводили на серых крысах 75-го поколения отбора на агрессивное поведение и для сравнения – на ручное. Целью данной работы было выяснить, сопровождается ли снижение стресс-реактивности у агрессивных крыс на современном этапе селекции ослаблением эффекта хэндлинга на агрессивность. Под влиянием неонатального хэндлинга у агрессивных животных обнаружено достоверное, но существенно меньшее, чем у крыс 44-го поколения, снижение агрессивности. При этом как у агрессивных, так и ручных крыс стрессорный уровень кортикостерона в крови возвращался к базальному уровню в течение более длительного времени, чем у соответствующих контрольных животных. Неонатальный хэндлинг вызывал понижение количества мРНК рецептора глюкокортикоидов (ГР) в гиппокампе агрессивных крыс, но достоверно не влиял на количество мРНК кортикотропин-рилизинг (КРГ) гормона в гипоталамусе. Однако в контроле отмечали более высокое содержание мРНК КРГ у агрессивных крыс относительно ручных и, наоборот, не обнаружили различий в количестве мРНК ГР между линиями в отличие от более ранних поколений. Показано, что хэндлинг детенышей положительно влиял на материнское поведение у ручных крыс. Таким образом, результаты, полученные в 75-м поколении отбора, свидетельствуют о том, что эффект хэндлинга на агрессивность ослабевает на фоне понижения стресс-реактивности у агрессивных крыс. Вероятно, это связано с изменением количества ГР в гиппокампе и усилением глюкокортикоидной обратной связи на современном этапе отбора. Небольшое увеличение продолжительности стресс-ответа, по-видимому, связано со стрессогенной составляющей неонатального хэндлинга и не связано с изменением материнской заботы.

Ключевые слова: неонатальный хэндлинг; агрессия; агрессивные крысы; ручные крысы; материнское поведение; отбор по поведению.

Effects of neonatal handling on behavior and stress-response in rats selected for reaction towards humans

Yu.E. Herbeck¹✉, O.A. Amelkina^{1, 2, 3}, M.Yu. Konoshenko¹, S.G. Shikhevich¹, R.G. Gulevich¹, R.V. Kozhemyakina¹, I.Z. Plyusnina¹, I.N. Oskina¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Department of Reproduction Biology

It is known that neonatal handling may cause long-term changes in neurobiological and behavioral phenotypes. Neonatal handling of rats selected for enhanced aggressiveness towards humans ("aggressive" rats of generation 44) significantly mitigated aggression and stress responsiveness. However, levels of corticosterone in stress in intact aggressive rats of later generations (70s) were lower than in generation 44, which differed little from the corresponding value in "tame" rats, selected in the opposite direction, for the absence of aggressiveness towards humans. The study was conducted with Norway rat populations of the 75th generation of selection for aggressive and tame behavior, respectively. The goal was to find out whether the decrease in stress response in aggressive rats at the current stage of selection was accompanied by a decrease in the influence of handling on aggressiveness. It was found that neonatal handling of aggressive animals caused a significant decrease in aggressiveness, although considerably smaller than in generation 44. In both aggressive and tame rats, the blood corticosterone level at stress was getting back to the basal level for a longer time than in the corresponding control groups. Neonatal handling decreased the amount of mRNA for the glucocorticoid receptor (GR) in the hippocampus of aggressive rats but did not affect significantly the amount of mRNA for the corticotropin-releasing hormone (CRH) in the hypothalamus. However, higher contents of CRH mRNA were recorded in aggressive rats than in tame ones in the control groups. However, no differences in glucocorticoid receptor mRNA

were found between the strains in contrast to earlier generations. It was shown that neonatal handling was beneficial or maternal behavior in tame rats. Thus, the results obtained in the 75th generation of selection indicate that the effect of handling on aggressiveness weakens with decreasing stress responsiveness in aggressive rats. This is likely to be related to the changing amount of GR in the hippocampus and stronger glucocorticoid-mediated feedback at the current stage of selection. The minor prolongation of the stress response appears to be related to the stressing component of neonatal handling rather than to changes in maternal care.

Keywords: neonatal handling; aggression; maternal behavior; aggressive rats; tame rats; selection for behavior.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гербек Ю.Э., Амелкина О.А., Коношенко М.Ю., Шихевич С.Г., Гулевич Р.Г., Кожемякина Р.В., Плюснина И.З., Оськина И.Н. Влияние неонатального хэндлинга на поведение и стресс-ответ у крыс, селекционируемых по реакции на человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):145-154. DOI 10.18699/VJ16.144

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Herbeck Yu.E., Amelkina O.A., Konoshenko M.Yu., Shikhevich S.G., Gulevich R.G., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Effects of neonatal handling on behavior and stress-response in rats selected for reaction towards humans. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):145-154. DOI 10.18699/VJ16.144

Внешние воздействия на ранних стадиях развития организма приводят к устойчивым изменениям поведенческих и гормональных ответов на широкий круг стрессорных агентов. Феномен ранних воздействий широко изучался еще в 60–70-х годах XX века (Levine, 1967). Однако в связи с высокой фундаментальной значимостью этого явления и из-за его существенного влияния на телесное и психическое здоровье человека количество исследований по данной тематике продолжает расти (Bagot, Meaney, 2010; Tang et al., 2014; Bale, 2015). Известно, что стресс, алкоголь, курение и другие факторы как на самых ранних, так и на поздних этапах беременности повышают риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, метаболических нарушений, психических расстройств, таких как шизофрения (Zhang et al., 2013; Bale, 2015). Чувствительными являются также ранний постнатальный и подростковый периоды. На этих этапах развития различные влияния среды могут вызывать устойчивые положительные или отрицательные изменения в организме (McEwen, 2000; Gonzalez-Liencrens et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Среди ранних воздействий широко исследованы яркие эффекты неонатального хэндлинга, который, как принято считать, обогащает раннюю социальную среду развивающегося организма. Они касаются поведения, гормонального стресс-ответа и связанной с ним тревожности и исследованы у разных животных (Levine, 1967; Liu et al., 1997; Kosten et al., 2006). Во многих исследованиях показано, что неонатальный хэндлинг снижает стресс-ответ, тревожность, эмоциональную реактивность у животных во взрослом состоянии (Levine, 1967; Liu et al., 1997). Молекулярным механизмом снижения глюкокортикоидного стресс-ответа в первую очередь считаются повышение количества рецептора глюкокортикоидов (ГР, NR3C1) в гиппокампе и снижение количества кортикотропин-рилизинг гормона (КРГ, CRH) в гипоталамусе (Liu et al., 1997).

Эффекты хэндлинга схожи с изменениями, наблюдаемыми у отловленных из природы крыс, после длитель-

ной селекции на отсутствие агрессивно-оборонительной реакции на человека («ручные» крысы) (Plyusnina, Oskina, 1997; Plyusnina et al., 2009; Гербек и др., 2010; Herbeck et al., 2010). То есть у этих животных одновременно со снижением стресс-ответа происходило и снижение агрессии по отношению к человеку. И. Оськина и И. Плюснина обнаружили, что неонатальный хэндлинг крыс, селекционируемых в противоположном направлении, на усиление агрессивно-оборонительной реакции по отношению к человеку («агрессивные», 44-е поколение), существенно снижает агрессию по отношению к человеку. Ранние воздействия также снижали стресс-ответ и повышали количество ГР в гиппокампе (Оськина, Плюснина, 1997). Необходимо также отметить, что эффекты неонатального хэндлинга отчасти обусловлены изменением материнского поведения после воздействия (Liu et al., 1997; Zhang et al., 2013). В то же время показано, что ручные и агрессивные крысы также различаются по материнскому поведению (Плюснина и др., 2013; Plyusnina et al., 2013).

Перечисленные результаты говорят в пользу того, что отбор по поведению у данных линий крыс являлся одновременно отбором на стресс-реактивность (Беляев, Бородин, 1982), а также могут указывать на схожесть некоторых механизмов, лежащих в основе эффектов хэндлинга и отбора на ручное поведение. Однако у ручных и агрессивных крыс современных (70-х) поколений отбора практически полностью отсутствуют различия в уровне глюкокортикоидного стресс-ответа в основном за счет снижения уровня стресс-индуцированной концентрации глюкокортикоидов в крови агрессивных крыс. В то же время ручное и агрессивное поведение по отношению к человеку у животных этих линий остается на прежнем уровне (Прасолова и др., 2014). Действительно, связь стресса и агрессии не является очевидной и у разных линий животных может выступать в различных сочетаниях (Gariépy et al., 2002; Veenema et al., 2007). Хэндлинг у ряда линий животных также не вызывает каких-либо изменений в стресс-ответе (Liu et al., 1997; Steimer et

al., 1998; Gariépy et al., 2002), а на агрессию производит усиливающий эффект (Gariépy et al., 2002; Todeschin et al., 2009). Так, у мышей линий NC100 (высокоагрессивные) и NC900 (низкоагрессивные) ранние воздействия приводят к повышению уровня межсамцовой агрессии, однако снижение кортикостерона обнаружено только у высокоагрессивной линии. При этом базальный и стресс-индуцированный уровни этого гормона у обеих линий не различались (Gariépy et al., 2002).

Таким образом, в данной работе поставлена цель выяснить, сохраняются ли эффекты неонатального хэндлинга, наблюдаемые на 44-м поколении селекции по реакции на человека, у агрессивных крыс 75-го поколения и влияет ли снижение стресс-ответа на современном этапе селекции на эти эффекты. Для достижения поставленной цели у взрослых ручных и агрессивных крыс, подвергнутых неонатальному хэндлингу, и контрольных животных исследовали поведение по отношению к человеку и показатели, связанные со стресс-ответом и изменяющиеся под действием факторов ранней среды. В их число вошли тревожность, концентрация кортикостерона и адренокортикотропного гормона (АКТГ) в плазме крови, мРНК КРГ в гипоталамусе и ГР в гиппокампе. Кроме того, исследовано материнское поведение крыс, пометы которых участвовали в эксперименте, как возможный фактор, влияющий на эффекты неонатального хэндлинга.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперименты проводили в соответствии с международными европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС) и российскими этическими стандартами по содержанию и обращению с лабораторными животными.

Работу проводили на двух аутбредных линиях серых крыс (*Rattus norvegicus*), полученных в ИЦиГ СО РАН путем длительной селекции на усиление («агрессивные») и отсутствие («ручные») агрессивно-оборонительного поведения по отношению к человеку (75-е поколение) (Plyusnina, Oskina, 1997). В опыт было взято по 16 ручных и агрессивных самок с первыми пометами по 6–8 детенышей. Крыс содержали на стандартном питании в условиях естественного светового дня при свободном доступе к воде и пище. Из самок с пометами были сформированы четыре группы: первые две группы подвергали неонатальному хэндлингу; третья (агрессивные) и четвертая (ручные) группы являлись контрольными.

Процедура неонатального хэндлинга и исследование поведения животных

В возрасте 4 мес. самок и самцов ссаживали попарно. На 20-й день самцов отсаживали, а самок рассаживали в клетки для изучения влияния хэндлинга на материнское поведение. Хэндлинг проводили ежедневно в одно и то же время первые 12 дней жизни крысят по методике, описанной ранее (Francis et al., 2002; Veenema, 2012). Мать отсаживали от помета в другую клетку, затем крысят по одному рукой в перчатке переносили в открытые пластмассовые контейнеры на опилки и оставляли на 15 мин, после чего детенышей, а затем и мать возвращали

в клетку. Животных из контрольной группы содержали в это время вместе с матерями и не подвергали никаким манипуляциям.

Автоматическую видеорегистрацию поведения самок проводили со 2-го по 12-й дни кормления крысят через каждые 3 мин в течение часа, пять раз в сутки согласно протоколу, описанному ранее (Плюснина и др., 2013; Plyusnina et al., 2013). Суммарное число наблюдений составляло 100 в сутки для каждой самки. Регистрировали следующие показатели материнского поведения: нахождение самки в гнезде (доля от суммарного времени наблюдения, %), кормление крысят и его типы, вылизывание и умывание крысят. Различали три типа кормления: «аркообразный» – спина самки выгнута дугой, самка стоит на вытянутых лапах; «платообразный» – самка практически лежит на крысятах, вытянув лапы; пассивный – самка лежит на боку или на спине. Оценивали частоту (%) проявления типов кормления от суммарного времени нахождения самки в гнезде.

В возрасте 1 мес. крысят отсаживали от матерей. В возрасте 2 мес. у всех самцов оценивали поведение по отношению к человеку при введении руки в перчатке в открытую дверцу клетки (тест на перчатку) по балльной шкале: от –4 (высокоагрессивное) до +4 (эмоционально положительное). Отрицательные значения указывают на наличие оборонительной агрессии по отношению к человеку, а положительные – на ее отсутствие. Подробно методика теста изложена в статьях (Plyusnina, Oskina, 1997; Plyusnina et al., 2009). В этом же возрасте животных рассаживали по половому признаку и содержали по четыре особи в клетке.

Через неделю по 12 самцов из каждой группы использовали для изучения эффектов хэндлинга на поведение крыс в тесте «светло-темная камера» и еще через неделю – в стартл-тесте. Тревожность крыс оценивали в тестах согласно стандартным протоколам (Konoshenko, Plyusnina, 2012). Крысу помещали в светло-темную камеру. Темная часть была сделана из непрозрачного винипласта, а светлую часть камеры, сделанную из прозрачного оргстекла, дополнительно освещали. Крысу помещали в светлый отсек камеры и в течение 5 мин производили видеонаблюдение. Оценивали латентный период захода в темную часть камеры и суммарное время, проведенное в ней, число заходов в темный отсек, выглядываний из него, вытянутых поз (задняя часть туловища крысы находится в темном отсеке, а передняя – в светлом), заглядываний из светлой части камеры в темную, вертикальных стоек и аутогруминга в светлой части камеры, время горизонтальной локомоции и застываний в светлой части камеры.

Стартл-тест проводили с помощью аппарата для измерения амплитуды реакции вздрагивания (TSE Equipment), представляющего собой звуконепроницаемый бокс с чувствительной платформой, на которую помещали рестрикционную клетку. Длительность адаптационного периода составляла 3 мин (белый шум, 65 дБ). Затем проводили измерение базальной активности (30 с), за которым следовали 10 звуковых стимулов (белый шум: 40 мс, 115 дБ). Длительность интервалов между стимулами – 15 с (белый шум, 65 дБ). Активность животных измеряли в течение 150 мс от начала стимула. Амплитуду

реакции вздрагивания вычисляли как максимальное давление на платформу, деленное на вес тела. Дополнительно вычисляли среднюю амплитуду вздрагивания для первых и вторых пяти акустических стимулов.

В возрасте 3 мес. по пять самцов каждой опытной группы подвергали быстрой декапитации (< 1 мин), после чего извлекали головной мозг, из которого брали образцы гиппокампа и гипоталамуса.

Исследование влияния неонатального хэндлинга на стресс-реактивность у ручных и агрессивных крыс

Рестрикционный стресс вызывали ограничением возможности передвижения, для чего трехмесячных самцов крыс помещали на 30 мин в сетчатые трубки диаметром 5 см. После всех манипуляций животных возвращали в клетки. Пробы крови брали до стресса, после его окончания, а также через 1, 2 и 4 ч после стресса. Измерение уровня кортикостерона в плазме крови крыс, подвергавшихся и неподвергавшихся неонатальному хэндлингу, проводили методом конкурентного белкового связывания (Murphy, 1967) в модификации Тинникова и Бажан (1984). Содержание адренкортикотропина (АКТГ) в плазме крови опытных и контрольных самцов крыс измеряли иммуоферментным методом с помощью ACTH ELISA Kit (Biomerica, США) согласно инструкции производителя.

Анализ количества мРНК рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе и кортикотропин-рилизинг гормона в гипоталамусе крыс

Для анализа количества мРНК в образцах мозга использовали метод ПЦР в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Выделение суммарной РНК из образцов гиппокампа и гипоталамуса (по пять крыс в каждой группе) проводили с использованием набора TRI Reagent (MRC, США), после чего удаляли примеси геномной ДНК с помощью дезоксирибонуклеазы I без РНКаз (Thermo Fisher Scientific). Процедуры выполняли согласно протоколам фирм-изготовителей. Синтез кДНК проводили, используя обратную транскриптазу ReverdAid (Thermo Fisher Scientific), при концентрации РНК 0,05 мкг/мкл согласно протоколу производителя транскриптазы. Для анализа экспрессии гена КРГ кДНК синтезировали при помощи праймеров polyT(15), а для оценки экспрессии гена ГР – используя специфические праймеры к мРНК ГР (5'-GCTGGATGGAGGAGAGCTTA-3') и мРНК циклофилина А (5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'; Peinnequin et al., 2004). Все праймеры синтезированы фирмой Biosset, Россия. ПЦР в реальном времени проводили на приборе ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь объемом 25 мкл включала: смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green и ROX (Синтол, Россия), 0,25 мкл продукта ОТ-реакции и праймеры для кДНК ГР (F: 5'-AGGGGAGGGGGAGC GTAATGG-3'; R: 5'-CCTCTGCTGCTTGGAATCTGC-3'), КРГ (F: 5'-AAAATGTGGATCCAAGGAGGA-3'; R: 5'-TAGCCACCCCTCAAGAATGAA-3') или циклофилина А (F: 5'-GTGTTCTTCGACATCACGGCT-3'; R: 5'-CTGTCTTTGGAACCTTGTCTGCA-3') (Marini et al., 2006). Каждую реакцию проводили в трех технических

повторах. Специфичность продукта оценивали путем анализа кривой плавления и электрофоретического разделения продукта в агарозном геле. С помощью программы REST 2009 (QIAGEN) определяли относительную экспрессию генов ГР и КРГ в разных группах, анализируя данные порогового цикла для каждого гена, нормализованные по пороговому циклу внутреннего контроля циклофилина А, и проводили попарные сравнения между группами. При этом учитывали эффективность реакции для каждой пары праймеров, рассчитанную с помощью серии разведений.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных по материнскому поведению, в тесте «на перчатку», в тесте «светло-темная камера» проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа, при котором в качестве факторов были генотип и процедура хэндлинга, с последующим сравнением групповых средних по критерию Fisher LSD. Средние значения амплитуды реакции вздрагивания в стартл-тесте для первых и вторых пяти стимулов, а также динамики стрессорных уровней кортикостерона и АКТГ были обработаны с помощью анализа ANOVA для повторных измерений (с генотипом и процедурой хэндлинга в качестве факторов), с последующим сравнением групповых средних по критерию Fisher LSD. Результаты на графиках представлены в виде значений среднего ± ошибка среднего. Статистическую достоверность различий между группами по результатам ПЦР оценивали с помощью рандомизированного критерия с двухточечным перераспределением с использованием программы REST 2009 (QIAGEN).

Результаты

Исследование поведения матерей, потомков которых подвергали неонатальному хэндлингу

В настоящей работе исследовали материнское поведение при хэндлинге и в контрольных группах у линий ручных и агрессивных крыс. Нахождение самки в гнезде, «аркообразный» тип кормления и взаимодействие матери с потомством (вылизывание) рассматриваются как индекс активной материнской заботы (Liu et al., 1997). «Аркообразный» тип кормления является самым эффективным, а пассивный – наименее эффективным для продукции молока и обеспечения наиболее высокой жизнеспособности крысят.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали достоверное влияние фактора генотипа на частоту нахождения в гнезде ($F_{1,2017} = 18,06$; $p < 0,001$), суммарную частоту кормления ($F_{1,2017} = 6,11$; $p = 0,01$), частоту аркообразного ($F_{1,1757} = 26,03$; $p < 0,001$) и пассивного ($F_{1,1757} = 33,99$; $p < 0,001$) типов кормления, а также процент груминга и вылизывания крысят ($F_{1,2017} = 4,94$; $p < 0,05$). Было выявлено также достоверное влияние фактора хэндлинга на частоту нахождения самки в гнезде ($F_{1,2017} = 4,01$; $p < 0,05$), частоту платообразного ($F_{1,1757} = 12,96$; $p < 0,001$) и пассивного ($F_{1,1757} = 9,02$; $p < 0,01$) типов кормления. Было продемонстрировано взаимодействие факторов генотипа и хэндлинга для

частоты нахождения в гнезде ($F_{1,2017} = 13,89$; $p < 0,001$), суммарной частоты кормления ($F_{1,2017} = 4,49$; $p < 0,05$), частоты аркообразного ($F_{1,1757} = 12,13$; $p < 0,001$) и пассивного ($F_{1,1757} = 18,95$; $p < 0,001$) типов кормления.

Частота нахождения в гнезде была достоверно меньше у ручных самок по сравнению с агрессивными, при этом процедура хэндлинга вызывала увеличение данного показателя у ручных крыс до уровня агрессивных (рис. 1). Частота кормления самкой детенышей была достоверно меньше у контрольной группы ручных крыс по сравнению с контрольными агрессивными животными. Не было обнаружено достоверного изменения данного параметра под воздействием хэндлинга у самок обоих генотипов. Частота аркообразного типа кормления была достоверно меньше у ручных самок по сравнению с агрессивными в контрольных группах (рис. 2). При этом хэндлинг вызвал достоверное уменьшение частоты аркообразного кормления у агрессивных самок и увеличение данного показателя у ручных. Частота платообразного типа кормления не различалась у крыс разных генотипов (рис. 2). В то же время хэндлинг вызвал достоверное увеличение частоты платообразного типа кормления у самок крыс обоих генотипов. Частота пассивного типа кормления была достоверно больше у ручных самок по сравнению с агрессивными, при этом процедура хэндлинга вызывала снижение данного показателя у ручных крыс до уровня агрессивных (рис. 2).

Исследование влияния ранних воздействий на поведение во взрослом состоянии у ручных и агрессивных крыс

Тест «на перчатку». Оборонительная агрессия была ярко выражена у агрессивных крыс контрольной группы и полностью отсутствовала у ручных животных, что соответствует более ранним исследованиям (Оськина, Плюснина, 1997; Plyusnina, Oskina, 1997). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние факторов генотипа ($F_{1,93} = 61,49$; $p < 0,001$), хэндлинга ($F_{1,93} = 6,34$; $p < 0,05$), а также взаимодействие данных факторов ($F_{1,93} = 5,70$; $p < 0,05$) на балльную оценку поведения крыс в тесте «на перчатку». Балльная оценка поведения агрессивных крыс была отрицательной ($-3,05 \pm 0,07$) (рис. 3) и достоверно отличалась от положительной балльной оценки ручных крыс ($+3,45 \pm 0,05$; $p < 0,001$). Процедура хэндлинга вызвала достоверное изменение балльной оценки агрессивных самок ($-2,66 \pm 0,09$; $p < 0,001$), но не повлияла на поведение ручных крыс в данном тесте ($+3,31 \pm 0,00$; $p > 0,05$) (рис. 3).

Стартл-тест. На рис. 4 изображены амплитуды вздрагивания ручных и агрессивных самок крыс в ответ на предъявление первых и вторых пяти акустических стимулов. Двухфакторный дисперсионный анализ данных для повторных измерений показал достоверное влияние фактора номера акустического стимула ($F_{1,44} = 79,05$; $p < 0,001$), а также фактора генотипа ($F_{1,44} = 8,80$; $p < 0,001$) на амплитуду реакции вздрагивания. Кроме того, было проделонстрировано взаимодействие факторов хэндлинга и номера стимула ($F_{1,44} = 10,38$; $p < 0,01$), а также факторов хэндлинга, номера стимула и генотипа ($F_{1,44} = 4,84$; $p < 0,01$).

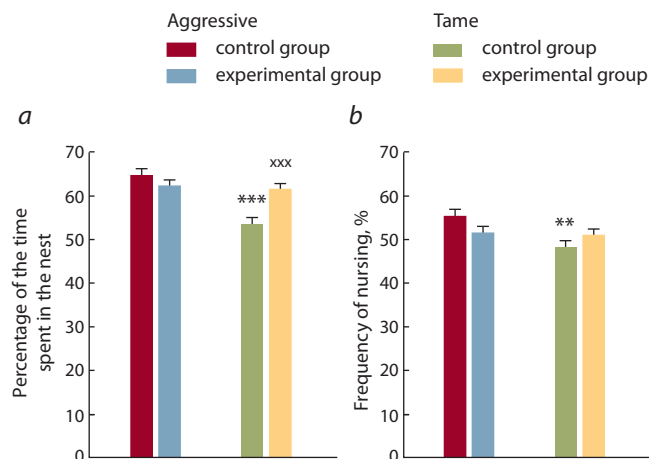


Fig. 1. Effect of pup handling on mother behavior indices in aggressive and tame female rats: (a) time spent in the nest, (b) frequency of nursing

In the experimental group, pups were exposed to neonatal handling, and in the control group, they were not. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to the aggressive control group; xxx $p < 0.001$ in the experimental group in comparison to the control group of the same genotype.

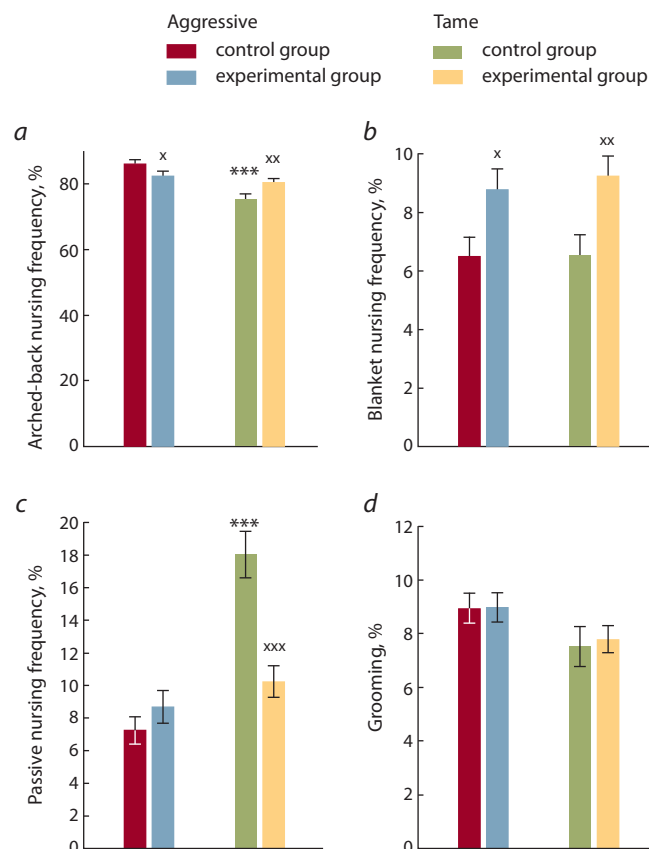


Fig. 2. Effect of pup handling on the frequency (as percentage of the total time spent in the nest by mothers) of behavior patterns in aggressive and tame rats: (a) arched-back nursing; (b) blanket nursing; (c) passive nursing; (d) pup grooming and licking.

*** $p < 0.001$ in comparison to the aggressive control group; * $p < 0.05$; xx $p < 0.01$; xxx $p < 0.001$ in the experimental group in comparison to the control group of the same genotype.

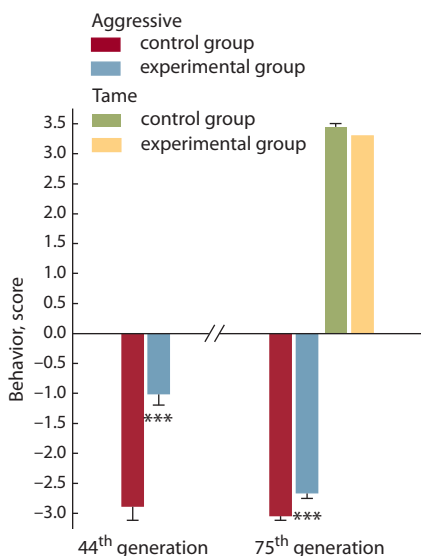


Fig. 3. Effect of neonatal handling on the behavior scores of adult aggressive and tame rats.

Here, in Figs. 4–7, and in the table the experimental group includes adult male rats exposed to handling in the neonatal period and the control group, adult male rats not exposed to neonatal handling. *** $p < 0.001$ in comparison to the control group of the corresponding behavior.

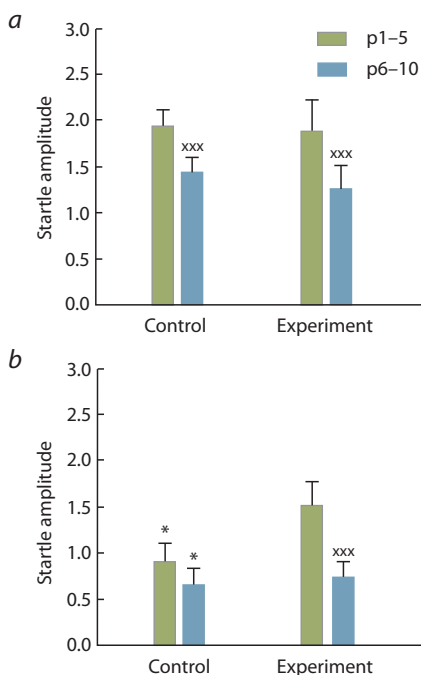


Fig. 4. Effect of neonatal handling on startle amplitude in response to the first five and subsequent five acoustic stimuli in rats: (a) aggressive, (b) tame.

p1–5, response to the first five stimulations; p6–10, response to the subsequent five stimulations; * $p < 0.05$ in comparison to the aggressive control group; *** $p < 0.001$ in comparison to the preceding five stimulations.

Средняя амплитуда вздрагивания в ответ на первые пять и последующие пять стимулов была достоверно меньше у ручных самцов контрольной группы по сравнению с агрессивными контрольными животными (рис. 4).

Достоверного изменения амплитуды вздрагивания под влиянием хэндлинга у агрессивных и ручных самцов обнаружено не было. Однако средняя амплитуда вздрагивания в ответ на первые пять стимулов была на уровне тенденции больше у опытной группы ручных крыс, чем у контрольной. Достоверных различий амплитуды вздрагивания между опытными группами крыс разного генотипа обнаружено не было.

Тест «светло-темная камера». Результаты дисперсионного анализа выявили достоверное влияние фактора генотипа на латентный период захода в темный отсек ($F_{1,44} = 5,87$; $p < 0,05$), время, проведенное в светлом отсеке ($F_{1,44} = 7,01$; $p < 0,01$), суммарное время застываний в светлом отсеке ($F_{1,44} = 9,41$; $p < 0,01$) и число высываний носа из темного в светлый отсек ($F_{1,44} = 8,03$; $p < 0,01$). Достоверного влияния фактора генотипа на другие показатели поведения в данном тесте, в том числе и на время, проведенное в светлом отсеке после выхода из темного, обнаружено не было. Суммарное время застываний было достоверно больше у контрольных агрессивных самцов по сравнению с контрольными ручными животными (рис. 5). Латентный период захода в темный отсек и время, проведенное в светлом отсеке, были на грани достоверности больше у агрессивных самцов, чем у ручных в контрольных группах животных (рис. 5). Классически данные параметры рассматриваются как показатель низкой тревожности, однако у агрессивных самцов они связаны с застыванием в светлом отсеке, а значит, указывают на большую тревожность, тем более что число высываний носа из темного в светлый отсек было на уровне тенденции меньше у агрессивных контрольных крыс, чем у ручных ($p = 0,07$) (рис. 5).

Достоверных изменений поведенческих параметров крыс обоих генотипов в тесте «светло-темная камера» под влиянием процедуры хэндлинга обнаружено не было.

Исследование влияния неонатального хэндлинга на стресс-реактивность у ручных и агрессивных крыс

Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние факторов генотипа ($F_{5,38} = 3,64$; $p < 0,01$) и хэндлинга ($F_{5,38} = 5,50$; $p < 0,001$) на динамику уровня кортикостерона. У обеих поведенческих групп как в контроле, так и опыте наблюдали достоверное повышение уровня кортикостерона в крови сразу и через час после окончания стрессорного воздействия по сравнению с базальным уровнем ($p < 0,001$) (рис. 6). Последующее сравнение групповых средних по критерию Fisher LSD показало достоверные различия между группами через 2 ч после окончания стресса. Концентрация кортикостерона в крови контрольных животных независимо от поведения уже возвращалась к базальным значениям, тогда как в экспериментальных группах это наблюдалось только через 4 ч. Уровень кортикостерона в плазме крови контрольных агрессивных животных был достоверно выше по сравнению с контрольными ручными через 2 и 4 ч после стресса ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) (рис. 6). В экспериментальных группах, отличающихся по поведению, различий в уровне гормона не обнаружено. Достоверные различия между контрольными и подвергавшимися хэндлингу крысами были выявлены только у ручных животных через 2 ч после стресса ($p < 0,05$) (рис. 6). У агрессивных животных значимого влияния экспериментального воздействия на уровень кортикостерона не обнаружено.

Кроме того, была изучена динамика изменения содержания АКТГ в плазме крови крыс. Двухфакторный дисперсионный анализ не показал достоверного влияния факторов генотипа на динамику изменения уровня гормона. Стрессорное воздействие достоверно увеличивало концентрацию АКТГ в крови всех исследованных групп животных ($p < 0,05$ – ручные контрольные; $p < 0,01$ – ручные опытные и $p < 0,001$ – обе группы агрессивных крыс) (рис. 7). Однако уже через 2 ч после окончания стресса у всех групп животных данный показатель достоверно не отличался от базального. Достоверных различий

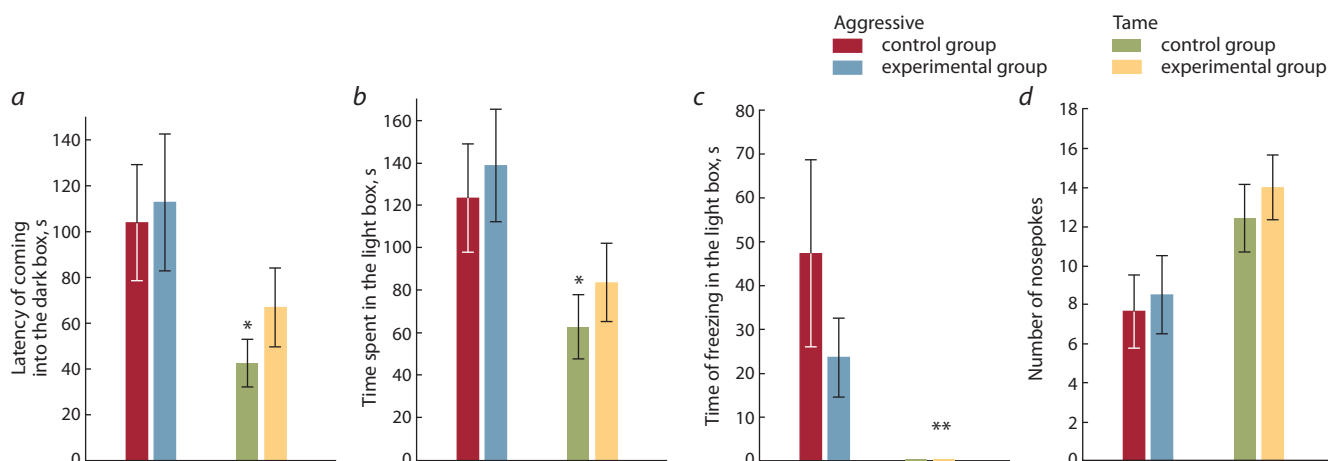


Fig. 5. Behavior of aggressive and tame rats in the light/dark test: (a) latency of coming into the dark box; (b) time spent in the light box; (c) total time of freezing in the light box; (d) number of nose pokes from the dark to the light box.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in comparison to the aggressive control group.

в уровне АКГГ между поведенческими, а также между контрольными и экспериментальными группами при попарном сравнении обнаружено не было.

Исследование количества мРНК рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе и кортикотропин-рилизинг гормона в гипоталамусе ручных и агрессивных крыс в норме и после неонатального хэндлинга

Анализ результатов ОТ-ПЦР в реальном времени не выявил достоверных различий в количестве мРНК ГР в гиппокампе между ручными и агрессивными крысами (таблица). В то же время было обнаружено небольшое, но достоверное уменьшение экспрессии КРГ в гипоталамусе ручных крыс относительно агрессивных ($p < 0,01$).

Неонатальный хэндлинг достоверно не повлиял на количество мРНК ГР в гиппокампе ручных крыс ($p < 0,05$) (таблица), однако немного, но достоверно снизил этот показатель у агрессивных ($p = 0,03$), причем количество мРНК ГР в гиппокампе агрессивных опытных крыс было достоверно ниже также по сравнению с ручными контрольными ($p = 0,03$) и опытными ($p < 0,001$) животными.

На количество мРНК КРГ в гипоталамусе ранние воздействия не оказали достоверного влияния (таблица): группа агрессивных опытных животных достоверно не отличалась

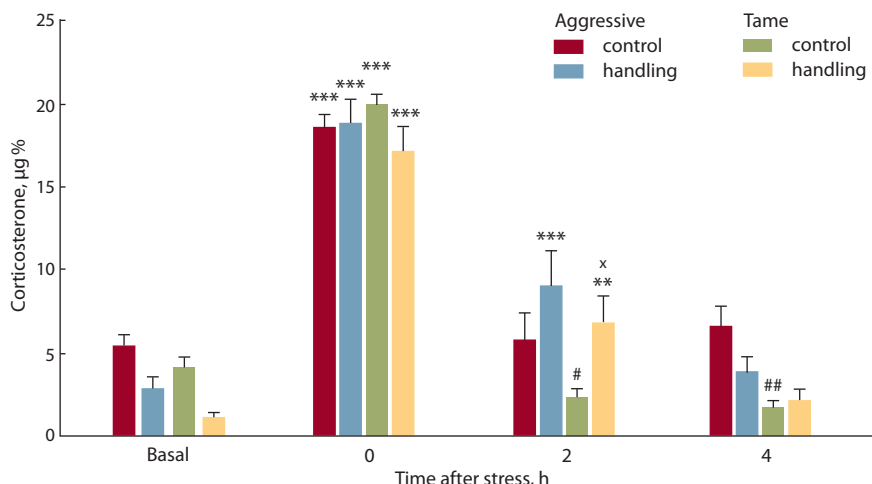


Fig. 6. Effect of neonatal handling on blood corticosterone concentrations after restriction stress in adult tame and aggressive rats.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to the basal level; * $p < 0.05$ in comparison to the control; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ in comparison to aggressive rats.

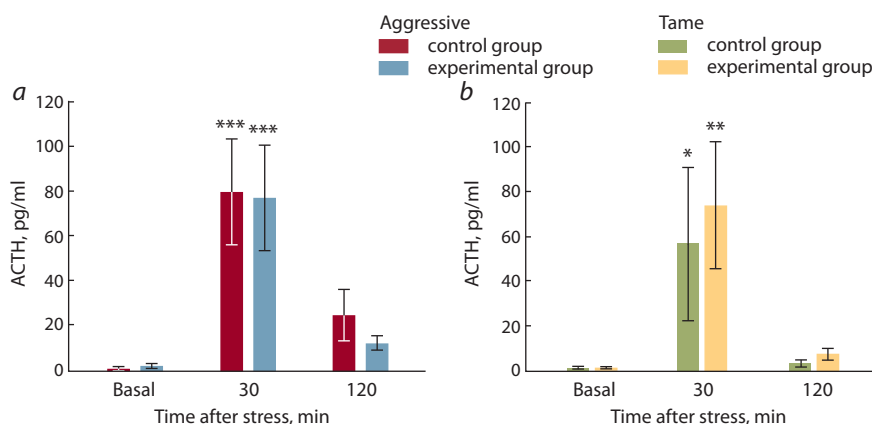


Fig. 7. Effect of neonatal handling on blood ACTH concentrations after restriction stress in adult rats: (a) tame; (b) aggressive.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in comparison to the basal level.

Effect of neonatal handling on the expression of hippocampal mRNA for the glucocorticoid receptor (GR) and the corticotropin-releasing hormone (CRH) in tame and aggressive rats

Groups of animals	Ratio of gene expression rates	S.E.	95 % CI	p	Result
GR receptor in the hippocampus					
Tame control vs. aggressive control	1.106	0.759–1.677	0.331–2.175	> 0.05	–
Tame experimental vs. tame control	1.106	0.759–1.677	0.331–2.175	> 0.05	–
Aggressive experimental vs. aggressive control	0.812	0.565–1.164	0.406–1.481	< 0.05	↓
Aggressive experimental vs. tame control	0.765	0.507–1.209	0.213–1.541	< 0.05	↓
Aggressive experimental vs. tame experimental	0.692	0.487–1.021	0.341–1.353	< 0.001	↓
CRH in the hypothalamus					
Tame control vs. aggressive control	0.742	0.455–1.261	0.314–1.702	< 0.05	↓
Aggressive experimental vs. aggressive control	1.114	0.680–1.926	0.474–2.396	> 0.05	–
Aggressive experimental vs. tame control	0.666	0.446–0.984	0.327–1.376	≤ 0.001	↓
Tame experimental vs. tame control	1.261	0.715–2.244	0.550–4.578	> 0.05	–
Tame experimental vs. aggressive control	0.979	0.497–1.699	0.344–4.257	> 0.05	–

Pairwise comparisons of GR and CRH gene expression in studied groups of rats. «↓». The expression in the first group in the row is significantly increased as compared to the corresponding reference group; CI. Confidence interval; S.E., Standard error.

от агрессивных контрольных ($p > 0,05$) и даже несколько больше, чем агрессивные контрольные животные, отличалась от ручных контрольных ($p = 0,001$); группа опытных ручных крыс достоверно не отличалась от контрольных ручных животных, однако в отличие от последних подвергнутые неонатальному хэндлингу крысы достоверно не отличались и от агрессивного контроля.

Обсуждение

Полученные в данной работе результаты показали, что длительный отбор крыс значительно ослабляет эффект неонатального хэндлинга на поведение по отношению к человеку у агрессивных крыс 75-го поколения по сравнению с животными 44-го поколения отбора (рис. 3; Оськина, Плюсина, 1997). Результаты измерений уровня кортикостерона в крови взрослых крыс сразу после стресса подтвердили, что агрессивные крысы современных поколений не отличаются от ручных по этому показателю, что соответствует проводимым недавно исследованиям (Прасолова и др., 2014) и противоположно результатам, полученным на предыдущих этапах отбора (Дыгало и др., 1985; Plyusnina, Oskina, 1997; Оськина и др., 2008). При этом неонатальный хэндлинг не изменял уровень кортикостерона, измеренный сразу после стресса, у исследуемых крыс в отличие от животных 44-го поколения (Оськина, Плюсина, 1997). Одним из основных механизмов действия неонатального хэндлинга на уровень стресс-ответа является, по-видимому, снижение количества ГР в гиппокампе (Liu et al., 1997). Поэтому ослабление эффекта воздействий может быть связано с исчезновением различий в экспрессии гена ГР у ручных и агрессивных крыс 75-го поколения по сравнению с данными предыдущих исследований (Оськина, Плюсина, 1997; Оськина и др., 2008; Гербек и др., 2010; Herbeck et al., 2010), что по ряду

признаков (Прасолова и др., 2014) указывает именно на повышение экспрессии гена у агрессивных животных. Это может быть связано с усилением глюкокортикоидной обратной связи у агрессивных крыс на современном этапе отбора. Отсутствие эффектов хэндлинга на стресс-реактивность было показано и на некоторых других линиях крыс и мышей (Liu et al., 1997; Steimer et al., 1998; Gariépy et al., 2002). Однако только в некоторых (Liu et al., 1997) отсутствие эффекта, по-видимому, было связано со сниженным уровнем кортикостерона и повышенным количеством мРНК ГР.

Несмотря на распространенное мнение о хэндлинге как о благоприятном воздействии, которое обогащает раннюю социальную среду развивающегося организма, он имеет и стрессогенную составляющую, которая может вызывать неблагоприятные эффекты, например, на социальное поведение (Macri et al., 2004; Tang et al., 2006). В нашем эксперименте небольшое влияние хэндлинга на стресс-ответ также было обнаружено как у ручных, так и агрессивных крыс. Оно заключалось не в снижении, а, наоборот, в более длительном сохранении стресс-индуцированного уровня глюкокортикоидов после стресса. Подобные изменения в стресс-ответе могут быть связаны с уменьшением количества ГР в гиппокампе или других структурах мозга, задействованных в глюкокортикоидной обратной связи. Небольшое, но достоверное повышение мРНК ГР обнаружено в гиппокампе у агрессивных крыс, подвергнутых неонатальному хэндлингу. У ручных крыс хотя и не было достоверных различий по этому показателю между опытной и контрольной группами, но не было обнаружено различий и с агрессивными крысами, подвергнутыми хэндлингу, и наблюдался значительный разброс данных внутри опытной ручной группы. Похожий эффект воздействия наблюдался и на экспрессию гена КРГ, различия

в которой, так же как и в уровне кортикостерона через 2 ч после стресса, исчезали и у ручных, и у агрессивных крыс. Таким образом, неонатальный хэндлинг мог подействовать на количество мРНК ГР и КРГ у обеих поведенческих групп, но был установлен только у агрессивных из-за небольшого эффекта.

Что касается тревожности, то она повышалась у ручных крыс под действием хэндлинга на уровне тенденции, что показала амплитуда вздрагивания в ответ на первые пять стимулов в стартл-тесте. Кроме того, этот показатель после ранних воздействий не отличался у ручных животных от агрессивных, что может быть связано с исчезновением различий в экспрессии гена КРГ, так как именно этот нейропептид, по-видимому, играет существенную роль во взаимосвязи стресс-ответа и тревожности (Blank, Spiess, 2010).

Несмотря на то что у ручных матерей было отмечено усиление материнского поведения после воздействия на их потомство, едва ли этот фактор имеет вклад в изменение стресс-ответа. Хотя и ручные, и агрессивные крысы имели однонаправленные изменения уровня кортикостерона вследствие неонатального хэндлинга, однако у агрессивных крыс в отличие от ручных было отмечено даже некоторое ослабление материнского поведения. Кроме того, из литературных источников известно, что усиление материнского поведения может, наоборот, снижать стресс-ответ у их потомков (Liu et al., 1997; Weaver et al., 2004). Разная реакция ручных и агрессивных матерей на воздействия, по-видимому, связана с изначальными различиями в поведении линий – усиленной материнской заботой агрессивных крыс по сравнению с ручными (Плюснина и др., 2013; Plyusnina et al., 2013).

Проведенные исследования по перекрестному вскармливанию ручных и агрессивных крыс также не показали изменений в оборонительной агрессии, а стресс-реактивность обеих линий несколько повысилась (Plyusnina et al., 2009). Исходя из этого небольшие изменения стресс-ответа, экспрессии генов ГР и КРГ во взрослом состоянии могут быть связаны со стрессогенной составляющей манипуляций, как это видно из исследований по перекрестному вскармливанию (Plyusnina et al., 2009).

Таким образом, к современным поколениям содержания в неволе агрессивные крысы под действием естественного и искусственного отбора, по-видимому, перестали воспринимать человека и условия вивария как стрессогенные. Поэтому агрессия по отношению к человеку, вероятно, в меньшей степени обусловлена страхом и стрессом и в большей степени – генотипом, чем на предыдущих этапах отбора, и мало зависит от хэндлинга и изменяющегося при этом материнского поведения. Сохраняющееся у крыс 75-го поколения небольшое снижение агрессии после неонатального хэндлинга можно объяснить некоторым снижением реакции страха вследствие регулярного проведения экспериментальной процедуры в неонатальный период.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project no. 0324-2015-0004.

It was contributed equally by Yu.E.H., O.A.A., M.Yu.K., and S.G.Sh.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bagot R.C., Meaney M.J. Epigenetics and the biological basis of gene × environment interactions. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 2010;49(8):752-771. DOI 10.1016/j.jaac.2010.06.001
- Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16:332-344. DOI 10.1038/nrn3818
- Belyaev D.K., Borodin P.M. Vliyaniye stressa na nasledstvennyuyu izmenchivost i ego rol v evolyutsii. *Evolutsionnaya Genetika* [Influence of stress on the genetic variability and its role in evolution. *Evolutionary Genetics*]. Leningrad: Leningrad State University Publ., 1982:35-59.
- Blank T., Spiess J. Corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-related peptides – a linkage between stress and anxiety. *Stress- From Molecules to Behavior: A Comprehensive Analysis of the Neurobiology of Stress Responses.* 2009. Weinheim: Wiley-VCH, 2010: 151-165.
- Dygalo N.N., Shishkina G.T., Borodin P.M., Naumenko E.V. Role of the brain neurochemical systems in altering the reactivity of the hypothalamic-adrenal system in the gray rat selected for behavior. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii* = *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 1985;21(4):342-347.
- Francis D.D., Diorio J., Plotsky P.M., Meaney M.J. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J. Neurosci.* 2002;22(18):7840-7843.
- Gariépy J.-L., Rodriguiz R.M., Jones B.C. Handling, genetic and housing effects on the mouse stress system, dopamine function, and behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002;73(1):7-17. DOI 10.1016/S0091-3057(02)00789-X
- Herbeck Y.E., Os'kina I.N., Gulevich R.G., Plyusnina I.Z. Effects of maternal methyl-supplement diet on hippocampal glucocorticoid receptor mRNA expression in rats selected for behavior. *Cytol. Genet.* 2010;44(2):108-113. DOI 10.3103/S0095452710020064
- Herbeck Y.E., Os'kina I.N., Gulevich R.G., Plyusnina I.Z. Effects of maternal methyl-supplement diet on hippocampal glucocorticoid receptor mRNA expression in rats selected for behavior. *TSitologiya i genetika* = *Cytology and Genetics.* 2010;44(2):45-52.
- Gonzalez-Lieners C., Shamay-Tsoory S.G., Brüne M. Towards a neuroscience of empathy: ontogeny, phylogeny, brain mechanisms, context and psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2013;37(8): 1537-1548. DOI 10.1016/j.neubiorev.2013.05.001
- Konoshenko M.Y., Plyusnina I.Z. Behavioral effects of bidirectional selection for behavior towards human in virgin and lactate Norway rats. *Behav. Processes.* 2012;90(2):180-188. DOI 10.1016/j.beproc.2012.01.007
- Kosten T.A., Lee H.J., Kim J.J. Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. *Brain Res.* 2006;1087:142-150. DOI 10.1016/j.brainres.2006.03.009
- Levine S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science.* 1967;156:258-260.
- Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997;277(5332):1659-1662.
- Macri S., Mason G.J., Wu H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur. J. Neurosci.* 2004;20(4):1017-24. DOI 10.1111/j.1460-9568.2004.03541.x
- Marini F., Pozzato C., Andreetta V., Jansson B., Arban R., Domenici E., Carboni L. Single exposure to social defeat increases corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus. *Brain Res.* 2006;1067:25-35. DOI 10.1016/j.brainres.2005.10.002

- McEwen B.S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22(2):108-124.
- Murphy B.E. Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1967;27:973-990.
- Oskina I.N., Herbeck Yu.E., Shikhevich S.G., Plyusnina I.Z., Gulevich R.G. Alterations in the hypothalamus-pituitary-adrenal and immune systems during selection of animals for tame behavior. *Informatsionnyy vestnik VOGiS=The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2008;12(1/2):39-49.
- Oskina I.N., Plyusnina I.Z. Pituitary-adrenal axis of wild gray rats under selection for domestic behavior and neonatal handling. *Materialy nauchnoy konferentsii «Endokrinnye mekhanizmy regulyatsii funktsiy v norme i patologii» [Proc. sci. conf. "Endocrine mechanisms of regulation of functions in health and disease"]*. Novosibirsk, 1997:114-115.
- Peinnequin A., Mouret C., Birot O., Alonso A., Mathieu J., Clarençon D., Agay D., Chancerelle Y., Multon E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunology*. 2004;5:3. DOI 10.1186/1471-2172-5-3
- Plyusnina I., Oskina I. 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., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K. Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human. *Behav. Genet.* 2009;39(2):202-212. DOI 10.1007/s10519-008-9248-6
- Plyusnina I.Z., Tarantsev I.G., Bulushev E.D., Konoshenko M.Y., Kozhemyakina R.V., Gerbek Y.E., Os'kina I.N. Analysis of maternal behavior in tame and aggressive gray rats. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity* 2013;63(3):375-383.
- Plyusnina I.Z., Tarantsev I.G., Bulushev E.D., Konoshenko M.Y., Kozhemyakina R.V., Gerbek Y.E., Os'kina I.N. Analysis of maternal behavior in tame and aggressive gray rats. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2014;44(8):856-862. DOI 10.1007/s11055-014-9993-3
- Prasolova L.A., Gerbek Yu.E., Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Yu., Kozhemyakina R.V., Oskina I.N., Plyusnina I.Z. The effects of prolonged selection for behavior on the stress response and activity of the reproductive system of male grey rats (*Rattus norvegicus*). *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2014;50(8):959-966.
- Steimer T., Escorihuela R.M., Fernández-teruel A., Driscoll A.P. Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1998;16(3-4):165-174. DOI 10.1016/S0736-5748(98)00032-X
- Tang A.C., Akers K.G., Reeb B.C., Romeo R.D., McEwen B.S. Programming social, cognitive, and neuroendocrine development by early exposure to novelty. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006;103:15716-15721.
- Tang A.C., Reeb-Sutherland B.C., Romeo R.D., McEwen B.S. On the causes of early life experience effects: evaluating the role of mom. *Front. Neuroendocrinol.* 2014;35(2):245-51. DOI 10.1016/j.yfrne.2013.11.002
- Tinnikov A.A., Bazhan N.M. Measuring glucocorticoids in the blood plasma and adrenals by competitive hormone binding by proteins without prior extraction. *Laboratornoye delo=Laboratory Science*. 1984;12:709-713.
- Todeschin A.S., Winkelmann-Duarte E.C., Jacob M.H., Aranda B.C., Jacobs S., Fernandes M.C., Ribeiro M.F., Sanvitto G.L., Lucion A.B. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm. Behav.* 2009;56(1):93-100. DOI 10.1016/j.yhbeh.2009.03.006
- Veenema A.H. Toward understanding how early-life social experiences alter oxytocin- and vasopressin-regulated social behaviors. *Horm. Behav.* 2012;61(3):304-312. DOI 10.1016/j.yhbeh.2011.12.002
- Veenema A.H., Torner L., Blume A., Beiderbeck D.I., Neumann I.D. Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Horm. Behav.* 2007;51(1):11-19. DOI 10.1016/j.yhbeh.2006.07.004
- Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004;7(8):847-854. DOI 10.1038/nn1276
- Zhang T.Y., Labonté B., Wen X.L., Turecki G., Meaney M.J. Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38:111-123. DOI 10.1038/npp.2012.149



Экспериментальный описторхоз: исследование состава форменных элементов крови, гемопоэза и стартл-рефлекса у лабораторных животных

Д.Ф. Августинович¹✉, И.А. Орловская², Л.Б. Топоркова², Г.Б. Вишневская¹, А.В. Катохин¹, М.Н. Львова¹, Е.В. Кашина¹, Н.П. Бондарь¹, Н.А. Фефанова^{1, 2}, 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 научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск, Россия

Один из видов семейства Opisthorchiidae – *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) – вызывает тяжелые нарушения в организме человека и животных, поэтому является объектом актуальных научных исследований. В работе проведено сравнительное исследование влияния инвазии *O. felineus* на изменение в составе форменных элементов крови, костномозгового гемопоэза и поведенческого рефлекса вздрагивания у мышей C57BL/6 и сирийских хомячков через две недели после инфицирования. Обнаружены существенные межвидовые различия по многим показателям. Было установлено, что относительная масса основного органа периферической иммунной системы – селезенки – у мышей существенно больше, чем у хомячков. Более того, инвазия *O. felineus* вызывала гипертрофию селезенки только у мышей. У хомячков были более выраженные отклонения от нормы в составе форменных элементов крови, которые сопровождалась активацией миело- и эритропоэза. У мышей установленные изменения в крови не сопровождалась сдвигами колониеобразующей активности костного мозга. Мыши отличались от хомячков и по реакции вздрагивания на акустический сигнал как по выраженности самой реакции, так и по величине преимпульсного ингибирования. У инфицированных хомячков не было реакции привыкания на звуковой сигнал. Кроме того, у хомячков созревание марит *O. felineus* происходило раньше, чем у мышей. Полученные данные говорят о большей резистентности мышей к инфицированию *O. felineus*, однако не исключают возможности использования мышей в качестве модельных при исследовании процессов, происходящих в организме хозяина на фоне экспериментального описторхоза.

Ключевые слова: *O. felineus*; острый описторхоз; хомячки; мыши; форменные элементы крови; красный костный мозг; гемопоэз; стартл-рефлекс.

Experimental opisthorchiasis: a study of blood cells, hematopoiesis and startle reflex in laboratory animals

D.F. Avgustinovich¹✉, I.A. Orlovskaya², L.B. Toporkova², G.B. Vishnivetskaya¹, A.V. Katokhin¹, M.N. Lvova¹, E.V. Kashina¹, N.P. Bondar¹, N.A. Feofanova^{1, 2}, V.A. Mordvinov^{1, 3}

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

² Scientific research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

³ Scientific research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

One of the species of the family Opisthorchiidae, *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*), causes severe disturbances in humans and animals, and so it is the subject of important research studies. Two weeks after infection we compared the impact of *O. felineus* invasion on the changes in blood cells composition, bone marrow hematopoiesis and behavioral startle-reflex in inbred C57BL/6 male mice and Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Considerable interspecies differences were revealed for many parameters estimated. It was found that the relative weight of the main organ of the peripheral immune system – spleen, is significantly larger in mice than in hamsters. Moreover, the infection with *O. felineus* caused a significant enlargement of the spleen only in mice. More pronounced changes in the blood cells composition, which was accompanied by activation of hematopoietic stem cells of myeloid and erythroid set, were determined in hamsters. Blood changes in the response to infection in mice were less severe and were not accompanied by the changes in colony formation. Mouse acoustic startle reaction differed from hamster one too. The expression of the startle reaction and the value of pre-pulse inhibition were discriminated in animals of two species. Infected hamsters had no reaction of habituation



to the sound stimulus. In addition, the maturation of *O. felinus* worms was faster in hamsters than in mice. Data obtained suggest a greater resistance of mice to *O. felinus* infection, but do not exclude the availability of mice as a model in the study of processes taking place in the host during the development of experimental opisthorchiasis.

Key words: *O. felinus*; acute opisthorchiasis; hamsters; mice; blood cells; red bone marrow; hemopoiesis; startle-reflex.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Августинович Д.Ф., Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Вишневская Г.Б., Катохин А.В., Львова М.Н., Кашина Е.В., Бондарь Н.П., Феофанова Н.А., Мордвинов В.А. Экспериментальный описторхоз: исследование состава форменных элементов крови, гемопоэза и стартл-рефлекса у лабораторных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):155-164. DOI 10.18699/VJ16.143

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Avgustinovich D.F., Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Vishnivetskaya G.B., Katokhin A.V., Lvova M.N., Kashina E.V., Bondar N.P., Feofanova N.A., Mordvinov V.A. Experimental opisthorchiasis: a study of blood cells, hematopoiesis and startle reflex in laboratory animals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):155-164. DOI 10.18699/VJ16.143

Описторхоз – паразитарное заболевание, широко распространенное во всем мире: 40 млн людей инфицированы трематодами семейства *Opisthorchiidae* и 750 млн находятся в группе риска (Keiser, Utzinger, 2007; Hung et al., 2013). Очевидно, что описторхоз, возникающий при заражении человека и животных представителями этого семейства, *Opisthorchis viverrini* (*O. viverrini*) и *Opisthorchis felinus* (*O. felinus*), является актуальной проблемой современности. Вид *O. viverrini* распространен преимущественно на территории Юго-Восточной Азии (Тайланд, Лаосская Народно-Демократическая Республика, Вьетнам, Камбоджа) (Keiser, Utzinger, 2007; Sripa et al., 2011). На территории Российской Федерации и стран Западной Европы преобладающим видом является *O. felinus*. Самый крупный очаг *O. felinus*-индуцированного описторхоза в России – Обь-Иртышский бассейн, где зараженность населения в Тюменской и Томской областях достигает 40–95 % (Adams, 2006; Ogorodova et al., 2007; Mordvinov, Furman, 2010; Pozio et al., 2013). Инфицирование метацеркариями *O. felinus* происходит при употреблении в пищу сырой или недостаточно термически обработанной рыбы семейства карповых. При заражении прежде всего страдает гепатобилиарная система, поскольку метацеркарии, попадая в организм окончательного хозяина, паразитируют во внутри- и внепеченочных желчных протоках, где они в течение месяца превращаются в половозрелых гельминтов (Бакштановская, Степанова, 2005; Adams, 2006; Sripa et al., 2007; Mordvinov et al., 2012; Pozio et al., 2013). У человека описторхоз провоцирует развитие тяжелых осложнений (гнойный холангит, холецистит, хронический гепатит, стриктуры желчевыводящих путей, абсцессы печени, обтурационную желтуху, панкреатит) и может способствовать возникновению холангиокарциномы (Бражникова, Толкаева, 2000, 2002; Бакштановская, Степанова, 2005; Sripa et al., 2007, 2012; Mairiang et al., 2012).

В настоящее время описторхоз рассматривается как системное заболевание, поскольку в патологический процесс вовлекаются органы и системы, которые не имеют непосредственного контакта с паразитами (Степанова

и др., 2004; Ахмедов, Критевич, 2009). Так, уже на ранних стадиях заболевания (острый описторхоз) в ответ на механическое повреждение эпителиальных клеток внутрипеченочных желчных протоков и на секрецию продуктов метаболизма паразита включаются защитные иммунные механизмы организма хозяина (Sripa et al., 2007). При этом изменения в клеточном составе крови и костном мозге появляются в организме окончательного хозяина одними из первых. Однако оценка колониеобразующей активности гемопоэтических предшественников в костном мозге при инфицировании *O. felinus* до сих пор не проводилась.

Известно, что хроническое воспаление печени нарушает нейротрансмиссию в мозге, что приводит к изменению в поведении (D'Mello, Swain, 2011). Описторхоз на хронической стадии заболевания обуславливает развитие у людей симптомов депрессивного спектра (Бронштейн, Лучшев, 1998). Можно полагать, что на ранних этапах (острый описторхоз) нарушения в мозге могут повлиять на проявление врожденных рефлексов (например, стартл-рефлекс или реакция вздрагивания (startle reaction) у человека и животных в ответ на резкий звуковой сигнал) (Paylor, Crawley, 1997). Этот рефлекс является универсальным для млекопитающих компонентом защитной реакции организма и характеризуется некоторыми формами пластичности, включая преимпульсное ингибирование (prepulse inhibition, PPI) и габитуацию (привыкание) (Hoffman, Searle, 1968; Graham, 1975; Geyer, Braff, 1987), которые одинаково проявляются у разных видов млекопитающих. Таким образом, пластичность стартл-реакции является идеальным кандидатом для трансляционных исследований (Braff et al., 2001). Преимпульсное ингибирование характеризует способность ЦНС фильтровать сенсорную информацию и проявляется в снижении моторной реакции организма на резкий стимул при наличии слабого предварительного стимула. Известно, что в норме после продолжительного ряда повторных стимулов происходит снижение стартл-реакции или габитуация (Geyer, Braff, 1987). Патологически усиленный рефлекс отличается от физиологического своей выраженностью и отсутствием привыкания к стимулу и может быть следствием разнообразных заболеваний, затрагивающих нервную систему.

Учитывая вышесказанное, полагаем, что проведение работы по моделированию инвазии *O. felinus* и исследование последствий инфицирования весьма актуальны. В настоящее время во всем мире такие эксперименты проводят на сирийских хомячках (*Mesocricetus auratus*), лабораторных животных, наиболее восприимчивых к инфицированию личинками описторхов (Sripa, Kaewkes, 2000; Jittimanee et al., 2007; Максимова и др., 2012; Lvova et al., 2012). В редких случаях описторхоз моделируют на других представителях млекопитающих, например, на серебристых лисицах (Schuster et al., 2003) или песчанках (*Meriones unguiculatus*) (Boonmars et al., 2009). В ранних исследованиях исключалась возможность моделирования *O. felinus*-индуцированного описторхоза у мышей инбредной линии C57BL/6 (Зеленцов, 1974). В то же время, как подчеркивают некоторые авторы (Choi et al., 2003), это создает определенные сложности для исследований, поскольку основные современные молекулярные и биохимические разработки в научных лабораториях подразумевают использование, прежде всего, крыс и мышей. Как сообщает компания Labome (2012), проанализировавшая около 10 000 публикаций за период 2008–2011 гг., мыши являются предпочтительными лабораторными животными для исследований, а инбредная линия мышей C57BL/6, геном которых был полностью секвенирован в 2005 г., на втором месте после генома человека, самая используемая линия для создания физиологических или патологических моделей в экспериментах *in vivo*.

В этой связи задачами нашего исследования было, во-первых, моделирование *O. felinus*-индуцированного описторхоза у мышей инбредной линии C57BL/6, во-вторых, изучение влияния инвазии *O. felinus* на изменения в составе форменных элементов крови, костномозгового гемопоэза и стартл-рефлекса у животных и, в-третьих, проведение сравнительного анализа данных показателей у сирийских хомячков и мышей на стадии острого описторхоза.

Материалы и методы

Животные. В работе были использованы самцы сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) и мышей инбредной линии C57BL/6 в возрасте 3–4 мес., полученные из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X00). Животных содержали в стандартных условиях: при световом режиме 12:12 ч (свет:темнота), температуре воздуха 23–24 °C; достаточном количестве гранулированного корма и воды. Группы мышей в клетках размером 36×23×12 см были сформированы в одномесечном возрасте. Хомячки были рассажены по одному в аналогичные клетки. Все процедуры были проведены согласно директивам European Communities Council от 24 ноября 1986 г. (86/609/EEC), а также заключению Комиссии по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 22 от 30 мая 2014 г.).

Процедура эксперимента. Животные каждого вида были разделены на две группы: контрольные (с введением физиологического раствора) и опытные, зараженные метацеркариями *O. felinus* в дозе 100 личинок на каждую особь. Введение осуществляли внутривентрикулярно с помощью зондов (Braintree Scientific, Inc.). Через 12 дней

у мышей и хомячков оценивали рефлекс вздрагивания на звуковой сигнал в приборе «SR-Pilot» (San Diego Instruments, Inc.). На третьи сутки после поведенческого тестирования животных умерщвляли декапитацией и производили забор крови, а также образцов красного костного мозга из берцовой кости для дальнейшего гематологического исследования. Кроме этого, определяли массу печени и селезенки в пересчете на 1 г массы тела животного. Печень с желчным пузырем помещали в физиологический раствор для дальнейшего микроскопического анализа числа и зрелости марит *O. felinus* в желчных протоках. Выделенных из печени марит переносили на предметное стекло для фотографирования (без фиксации и подкрашивания), проведенного в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН на микроскопе Axioskop 2 plus, оснащенный AnxioCamp HRc камерой (Zeiss, Германия).

Получение метацеркарий *O. felinus*. Личинки *O. felinus* были получены из инфицированных язей, выловленных из р. Обь Новосибирской области. Рыбный фарш обрабатывали в 1 %-м растворе хлористого пепсина и инкубировали при 37 °C в течение ночи с последующей фильтрацией и осаждением в 0,9 %-м растворе хлористого натрия. Под микроскопом определяли жизнеспособность метацеркарий для дальнейшего введения животным.

Следует подчеркнуть, что в проведенном исследовании была соблюдена полная стандартизация заражения животных двух видов – хомячков и мышей. Во-первых, и хомячкам, и мышам была введена одинаковая доза личинок *O. felinus* (100 метацеркарий/особь). Во-вторых, метацеркарии были извлечены из одной партии язей, выловленных в р. Обь в один сезон (конец мая). Инфицирование и исследование параметров у представителей двух видов было сделано параллельно в одно и то же время. Эти условия необходимы для корректного сопоставления оцениваемых показателей.

Анализ клеточного состава периферической крови и оценка количества коммитированных предшественников клеток костного мозга. Клеточный состав крови мышей и хомячков оценивали с помощью гематологического анализатора PCE-90 (ERMA Inc., Япония). Относительное количество форменных элементов крови мышей и хомячков подсчитывали в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе, затем рассчитывали их абсолютную численность.

Костный мозг животных вымывали из бедренной кости с помощью шприца кондиционной средой RPMI1640, содержащей 10 % FCS. Подсчитывали количество клеток костного мозга в 1 мл среды с помощью гематологического анализатора (ERMA Inc., Япония). Для определения числа коммитированных предшественников клетки костного мозга животных в концентрации $2,0 \times 10^4$ /мл инкубировали в 24-луночных планшетах в метилцеллюлозной среде M 3434 (Stem Cell Technology, Канада), содержащей цитокины SCF, EPO, IL-3, IL-6. Гранулоцитарно-макрофагальные (КОЕ-ГМ), бурс-образующие и колониобразующие эритроидные (БОЕ-Э, КОЕ-Э) и гранулоцитарно-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарные (КОЕ-ГЭММ) колонии подсчитывали под инвертированным микроскопом после 14-дневной ин-

кубации при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂, согласно рекомендациям производителя (Stem Cell Technologies, Канада).

Измерение стартл-рефлекса и его преимпульсного ингибирования. Реакцию вздрагивания в ответ на акустический стимул измеряли с помощью прибора «SR-Pilot» (San Diego Instruments), состоящего из пластиковой камеры (15 × 19 × 25 см), в пол которой вмонтированы пьезоэлектрические датчики, включающиеся в момент подачи звукового сигнала. Фоновый белый шум составлял 65 дБ. Животное помещали в камеру и после 3 мин адаптации предъявляли четыре импульса (P) интенсивностью 115 дБ и длительностью 40 мс, чередовавшихся с четырьмя импульсами, предваряемыми слабыми (85 дБ, 40 мс) преимпульсами (PP), которые давались за 100 мс до основного импульса. Интервал между одиночными стимулами (P) и комбинацией (PP) составлял 15 с. Величина реакции животного на стимулы отражалась на экране прибора в виде относительных единиц. Значение преимпульсного ингибирования (PPI) (в процентах) рассчитывали по формуле: $100 - PP \times 100/P$ (Paylor, Crawley, 1997).

Статистика. Поскольку большинство исследуемых параметров имели нормальное распределение согласно W-критерию Shapiro-Wilk (Statistica 6.0), использовали параметрические методы обработки полученных данных. Для этого применяли двухфакторный дисперсионный анализ с последующим post-hoc сравнением групп по критерию Fisher LSD. В качестве первого фактора был взят «вид животных» (хомячки, мыши), в качестве второго – «воздействие» (контроль – введение физиологического раствора, опыт – введение метацеркарий *O. felinus*). При сравнении массы тела у животных в качестве первого фактора была взята «временная точка измерения» (исходная – перед заражением, конечная – через 14 дней после инфицирования), в качестве второго – «воздействие». Для сравнения числа марит в желчных протоках инфицированных мышей и хомячков, а также величины реакции вздрагивания животных на первый и четвертый стимул в контрольной и опытной группах применяли *t*-критерий Стьюдента для независимых и зависимых параметров соответственно. В каждой группе было по 7–13 животных. Данные представлены как среднее ± SEM. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ и на уровне тенденции при $0,05 < p < 0,1$.

Результаты

Установлено, что через две недели после инвазии личинок *O. felinus* количество марит в желчных протоках хомячков и мышей было приблизительно одинаковым [(24,89 ± 2,29; $n = 9$) и (29,69 ± 2,92; $n = 13$) соответственно; $t = 1,20$; $p = 0,24$].

Обнаружена разная степень зрелости марит, в зависимости от вида хозяина. У гельминтов, извлеченных из мышей, хорошо визуализировали лишь заполненный кишечник (рис. 1). У марит из хомячков идентифицировали семенники, матку с яйцами и желточники, что предполагает начало яйцепродукции. Кроме того, у хомячков мариты были крупнее, чем у мышей. Наряду с более зрелыми маритами в желчных протоках печени хомячков также были обнаружены незрелые особи.

Исследование показало, что хомячки и мыши, зараженные личинками *O. felinus*, в течение двух недель после инфицирования набирали массу тела по-разному (рис. 2). Хомячки как контрольной, так и экспериментальной групп увеличили массу тела за две недели, влияние фактора «временная точка измерения» было статистически значимым [$F(1,28) = 16,2$; $p = 0,001$], как и влияние фактора «воздействие» [$F(1,28) = 4,3$; $p = 0,047$]. Взаимодействия факторов не было. Прирост массы был более выраженным у контрольных хомячков ($p = 0,005$) по сравнению с инфицированными ($p = 0,014$).

У мышей конечная масса тела отличалась от исходной [$F(1,48) = 15,4$; $p = 0,001$] – для первого фактора в равной степени как у контрольных, так и у опытных животных [$F(1,28) = 2,0$; $p = 0,162$] – для второго фактора. Взаимодействие факторов не установлено. Прирост массы тела мышей был значимым как на фоне инфицирования ($p = 0,006$), так и без него ($p = 0,010$).

Через две недели после заражения относительная масса печени не менялась у представителей двух видов [$F(1,38) = 1,5$; $p = 0,236$] (рис. 3). Обращает на себя внимание, что у мышей относительная масса печени как у контрольных, так и у зараженных была значительно больше, чем соответствующие показатели у хомячков, влияние фактора «вид животных» было значимым [$F(1,38) = 37,3$; $p = 0,000$]. Взаимодействие факторов не установлено.

Относительная масса селезенки также зависела от вида животных и была в обоих случаях (контроль, опыт) существенно больше у мышей [$F(1,38) = 46,2$; $p = 0,000$]. Более того, прирост относительной массы селезенки зависел от инфицирования [$F(1,38) = 17,5$; $p = 0,000$]. Взаимодействия факторов не было. Post-hoc анализ показал, что у хомячков повышение этого показателя было на уровне тенденции ($p = 0,064$), а у мышей существенно более выраженное ($p = 0,000$).

Анализ состава форменных элементов крови выявил значительные его изменения на фоне инвазии *O. felinus* (таблица), при этом более выраженные у хомячков. Число палочкоядерных нейтрофилов зависело как от фактора «вид животных» [$F(1,24) = 22,7$; $p = 0,000$], так и от фактора «воздействие» [$F(1,24) = 42,7$; $p = 0,000$]. Взаимодействие факторов было статистически значимым [$F(1,24) = 30,5$; $p = 0,000$]. Дальнейшее post-hoc сравнение показало, что этот параметр значительно возрос у хомячков ($p = 0,000$), но не у мышей ($p = 0,481$). Хомячки и мыши различались также по числу сегментоядерных нейтрофилов [$F(1,24) = 12,0$; $p = 0,002$], однако влияние фактора «воздействие» было на уровне тенденции [$F(1,24) = 3,0$; $p = 0,099$], взаимодействия факторов не было. Введение метацеркарий *O. felinus* значительно снижало этот показатель у хомячков ($p = 0,044$), но не у мышей ($p = 0,756$). В отличие от хомячков, у мышей увеличилось число базофилов после заражения ($p = 0,001$), воздействие было существенным [$F(1,24) = 8,5$; $p = 0,008$]. Более того, мыши после воздействия значительно отличались от хомячков по этому показателю ($p = 0,000$). Влияние фактора «вид животных» [$F(1,24) = 11,5$; $p = 0,002$] и взаимодействия факторов были значимыми [$F(1,24) = 8,5$; $p = 0,008$]. И у хомячков ($p = 0,000$), и у мышей ($p = 0,001$) существенно повышалось число эозинофилов после инфици-

рования, о чем свидетельствует фактор «воздействие» [$F(1,24) = 49,6; p = 0,000$]. Через две недели после заражения животные двух видов несколько различались по этому показателю ($p = 0,063$), однако выраженных межвидовых различий не было [$F(1,24) = 1,5; p = 0,233$], как не было и взаимодействия факторов. Обращает на себя внимание то, что животные различались по числу гранулоцитов исходно ($p = 0,002$) и после ($p = 0,000$) инвазии *O. felinus*. Оба фактора влияли на этот показатель [$F(1,24) = 42,8; p = 0,000$] – «вид животных»; [$F(1,24) = 8,2; p = 0,009$] – «воздействие», взаимодействия факторов не было. При этом в ответ на инфицирование снижалось количество лимфоцитов у хомячков ($p = 0,005$), но не у мышей ($p = 0,368$). По числу моноцитов наблюдалась обратная картина: их было значительно меньше у контрольных ($p = 0,000$) и опытных ($p = 0,002$) мышей, чем у хомячков соответствующих групп. Это отражено в значимости фактора «вид животных» [$F(1,24) = 31,0; p = 0,000$]. При этом влияния фактора «воздействие» не обнаружено у представителей двух видов [$F(1,24) = 1,9; p = 0,182$] и не было взаимодействия факторов. Если рассматривать абсолютное содержание в крови лейкоцитов в целом, то введение метацеркарий *O. felinus* не влияло на него как у хомячков, так и у мышей [$F(1,23) = 0,2; p = 0,639$] и не было также видовых различий по этому показателю [$F(1,23) = 2,4; p = 0,137$]. Взаимодействие факторов отсутствовало. По количеству эритроцитов животные двух видов исходно не различаются. После инфицирования их было несколько больше в крови мышей, чем у хомячков ($p = 0,058$). Однако не установлено влияния обоих факторов на этот показатель [$F(1,24) = 1,1; p = 0,306$] и [$F(1,24) = 0,3; p = 0,617$] и их взаимодействие. В то же время содержание гемоглобина в крови зависело от инфицирования [$F(1,23) = 4,5; p = 0,046$]: оно несколько снижалось у хомячков ($p = 0,065$). При этом животные двух видов не различались существенно по этому показателю [$F(1,23) = 0,1; p = 0,708$], взаимодействия факторов не было. Межвидовые различия установлены и по числу тромбоцитов [$F(1,24) = 8,9; p = 0,006$]: в крови мышей обеих групп (контрольные, опытные) их больше, чем у хомячков ($p = 0,046$ и $p = 0,044$ соответственно). Количество тромбоцитов не менялось у животных двух видов после заражения [$F(1,24) = 0,1; p = 0,866$]. Отношение суммарного объема всех форменных элементов (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) к общему объему крови (гематокрит) исходно было существенно ниже у мышей, чем у хомячков ($p = 0,001$). Влияние фактора «вид животных» было статистически значимым [$F(1,24) = 14,3; p = 0,000$]. Введение хомячкам личинок *O. felinus* несколько снижало этот показатель ($p = 0,084$), так что после заражения хомячки и мыши не различались по гематокриту. Однако значимого влияния фактора «воздействие» и взаимодействия факторов не было.

Анализ колониеобразующей активности клеток костного мозга выявил существенные межвидовые различия в реакции на инвазию *O. felinus* (рис. 4). Как видно на рис. 4, у хомячков наблюдалось «оживление» костномозгового гемопоэза, у мышей не было значимых изменений показателей колониеобразующей активности. Количество ранних предшественников (КОЕ-ГЭММ) в костном мозге

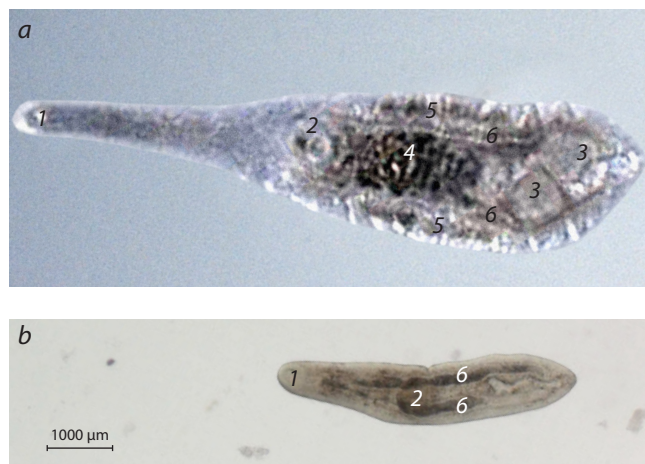


Fig. 1. *O. felinus* worms isolated from the bile ducts of the liver and gall bladder of (a) hamsters and (b) mice.

Worms from hamsters are illuminated from above; worms from mice, from below. Organs: 1, oral sucker; 2, ventral sucker; 3, testes; 4, uterus; 5, vitellaria; 6, caecum branches.

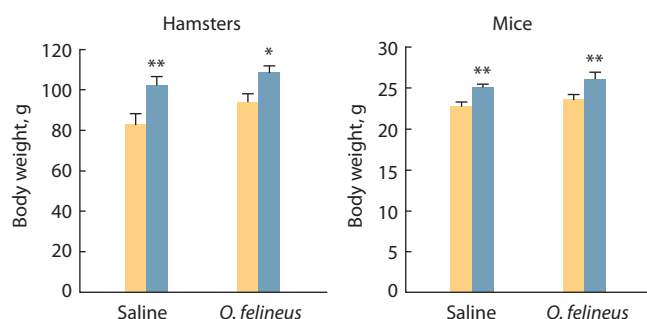


Fig. 2. Body weight dynamics in control (saline) and experimental (*O. felinus* infection) mice and hamsters.

Yellow bars indicate the initial weight; blue bars, the final weight. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, compared to the initial weight; (Fisher LSD test).

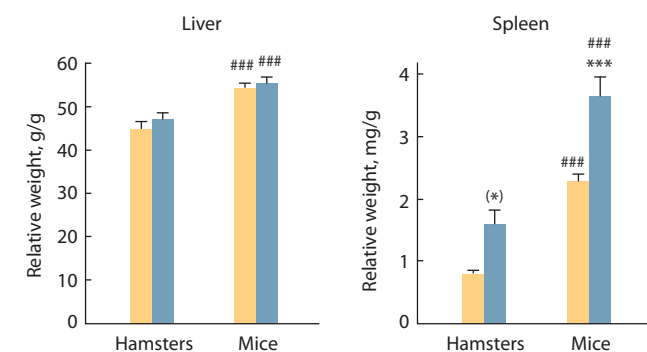


Fig. 3. Changes in the relative weight of liver and spleen in hamsters and mice having received *O. felinus*.

Yellow bars, control animals; blue bars, experimental animals.

(*) $0,05 < p < 0,10$; *** $p < 0,001$, compared to the control. ### $p < 0,001$, compared to the respective group of hamsters (Fisher LSD test).

Changes in the blood cell composition in animals infected with *O. felinus*

Blood cells	Hamsters		Mice	
	Control	Experiment	Control	Experiment
Leukocytes ($\times 10^9$ U/L)	14.01 $\pm$ 3.15	17.36 $\pm$ 3.26	12.07 $\pm$ 2.24	11.21 $\pm$ 1.09
Neutrophils, %				
stab	0.29 $\pm$ 0.18	20.71 $\pm$ 3.08***	1.57 $\pm$ 0.48	3.29 $\pm$ 1.32###
segmented	20.57 $\pm$ 2.83	13.71 $\pm$ 2.22*	9.71 $\pm$ 2.31##	8.71 $\pm$ 1.63
Basophils, %	0.57 $\pm$ 0.20	0.57 $\pm$ 0.70	0.71 $\pm$ 0.29	2.43 $\pm$ 0.43*** ###
Eosinophils, %	0.29 $\pm$ 0.18	4.29 $\pm$ 0.61***	0.43 $\pm$ 0.21	3.00 $\pm$ 0.65*** (#)
Lymphocytes, %	65.43 $\pm$ 3.39	51.29 $\pm$ 4.26**	81.29 $\pm$ 2.60##	77.14 $\pm$ 2.09###
Monocytes, %	13.00 $\pm$ 1.63	10.86 $\pm$ 0.67	6.29 $\pm$ 1.08###	5.43 $\pm$ 0.69##
Erythrocytes ($\times 10^{12}$ U/L)	9.72 $\pm$ 0.72	7.70 $\pm$ 0.87	9.09 $\pm$ 1.02	10.20 $\pm$ 0.92(##)
Hemoglobin, g/L	18.29 $\pm$ 0.83	14.94 $\pm$ 1.62(*)	17.10 $\pm$ 0.65	15.19 $\pm$ 1.45
Hematocrit, %	76.74 $\pm$ 5.66	62.40 $\pm$ 7.14(*)	45.86 $\pm$ 5.18###	50.70 $\pm$ 4.09
Platelets ($\times 10^9$ U/L)	228.29 $\pm$ 23.94	253.71 $\pm$ 55.72	722.26 $\pm$ 316.73#	753.50 $\pm$ 80.15#

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; (*) $0.05 < p < 0.10$, compared to the corresponding control; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; (##) $0.05 < p < 0.10$, compared to the corresponding parameter in hamsters; (Fisher LSD test).

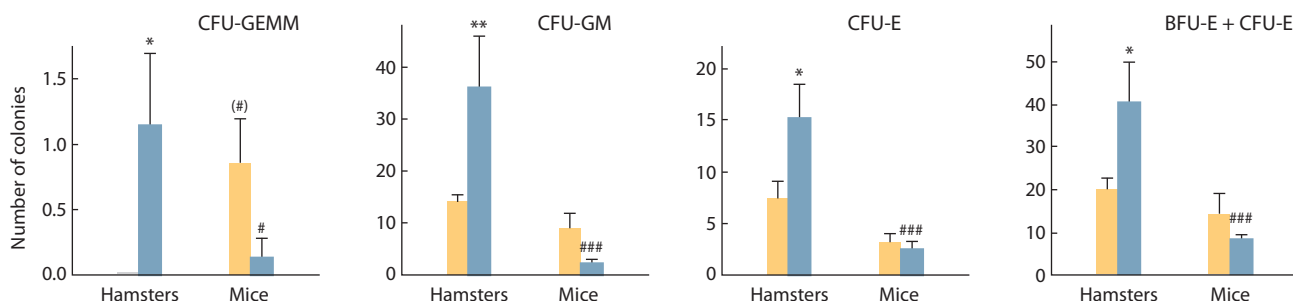


Fig. 4. The colony-forming activity of bone marrow cells in hamsters and mice having received *O. felinus*.

Yellow bars, control animals; blue bars, experimental animals; BFU-E, burst-forming unit erythroid; CFU-E – colony-forming unit erythroid; CFU-GM, colony forming unit of granulocytes and/or macrophages; CFU-GEMM, pluripotent hemopoietic stem cells; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to the control; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$; (##) $0.05 < p < 0.1$, compared to the respective group of hamsters (Fisher LSD test).

мышей исходно несколько превышало этот показатель ($p = 0,081$) у хомячков, однако через две недели после заражения наблюдалось статистически значимое увеличение КОЕ-ГЭММ у хомячков ($p = 0,023$) настолько, что инфицированные животные двух видов существенно различались по этому показателю ($p = 0,044$). При статистически незначимом влиянии обоих факторов на этот показатель {[$F(1,24) = 0,1$; $p = 0,832$] – «вид животных» и [$F(1,24) = 0,4$; $p = 0,525$] – «воздействие»} установлено их взаимодействие [$F(1,24) = 7,8$; $p = 0,010$]. Хомячки и мыши исходно не различались по числу гранулоцитарно-макрофагальных предшественников ($p = 0,481$). Однако после инвазии *O. felinus* у хомячков количество КОЕ-ГМ резко увеличилось ($p = 0,007$), в то время как у мышей не наблюдалось изменения объема данной популяции предшественников. В результате этого инфицированные хомячки и мыши стали статистически значимо различать-

ся по этому показателю [$F(1,24) = 14,2$; $p = 0,001$]. При отсутствии влияния фактора «воздействие» [$F(1,24) = 2,1$; $p = 0,156$] статистически значимым было взаимодействие двух факторов [$F(1,24) = 7,6$; $p = 0,011$]. Число эритроидных предшественников (как ранних, БОЕ-Э, так и суммарных, БОЕ-Э+КОЕ-Э) также увеличивалось у хомячков после заражения ($p = 0,011$ и $p = 0,020$ соответственно), в результате чего обнаружены межвидовые различия по этому показателю {[$F(1,24) = 18,5$; $p = 0,000$] и [$F(1,24) = 10,8$; $p = 0,003$] соответственно}. Хотя исходно популяции эритроидных предшественников были сравнимы у мышей и хомячков. При отсутствии выраженного влияния фактора воздействия для КОЕ-Э [$F(1,24) = 3,1$; $p = 0,089$] и БОЕ-Э+КОЕ-Э [$F(1,24) = 1,5$; $p = 0,228$] в обоих случаях установлено взаимодействие факторов {[$F(1,24) = 4,6$; $p = 0,043$] и [$F(1,24) = 5,2$; $p = 0,032$] соответственно}.

При исследовании поведенческой реакции вздрагивания у животных установлены межвидовые различия по PPI [$F(1,29) = 5,3$; $p = 0,029$] (рис. 5). У мышей этот параметр исходно оказался ниже, чем у хомячков ($p = 0,009$). Влияние фактора «воздействие» на этот показатель не обнаружено, как и не было взаимодействия факторов {[$F(1,29) = 0,0$; $p = 0,914$] и [$F(1,29) = 2,8$; $p = 0,104$] соответственно}. Различались животные двух видов и по реакции привыкания на звуковой стимул (рис. 5). У контрольных хомячков реакция на четвертый звуковой сигнал была сниженной ($t = 3,12$; $p = 0,026$), у зараженных хомячков такого снижения не обнаружено. У мышей как в контрольной, так и в опытной группе изменений реакции на звуковой сигнал не было.

Обсуждение

Проведенное исследование, стандартизованное по способу заражения, выявило некоторые общие и видоспецифические особенности реагирования животных на инфицирование метацеркариями *O. felinus*.

Установлено, что и у хомячков, и у мышей через две недели после инвазии количество марит *O. felinus* в желчных протоках печени было одинаковым. Однако у хомячков наряду с незрелыми маритами были обнаружены и более развитые особи, у которых визуализировался процесс яйцеобразования. У мышей все мариты были незрелые, меньшего размера, чем у хомячков, и имели только развитый кишечник. Следовательно, созревание марит *O. felinus* у представителей двух видов идет по-разному, быстрее развитие описторхов происходит в хомячках. Этот факт объясняет преимущественное использование в экспериментах сирийских хомячков в качестве модельных животных для изучения процессов описторхоза у млекопитающих (Boonmars et al., 2009).

Очевидно, что причины неодинакового созревания марит *O. felinus* связаны с разной защитной реакцией хозяина, обусловленной нейро-иммуно-эндокринным статусом. В этой связи обращает на себя внимание большая относительная масса селезенки у мышей, по сравнению с хомячками. Причем в ответ на инфицирование этот показатель у мышей, в отличие от хомячков, еще более увеличивался. Учитывая то, что селезенка является самым крупным органом периферической иммунной системы, в которой происходит дифференцировка зрелых В-лимфоцитов в плазмциты — основные антителопродуценты организма (Прокопенко, Волина, 2001), можно полагать, что у мышей выше степень иммунной защиты от личинок *O. felinus*. При этом инфицированные животные обоих видов за две недели опыта набирали массу тела так же, как и незараженные сородичи, но у инфицированных хомячков этот прирост был слабее, чем у инфицированных мышей, что может также косвенно свидетельствовать о большей восприимчивости хомячков к инфицированию, которая проявляется в некотором ингибировании метаболических процессов.

Кровь, будучи связующим звеном всех систем и органов, одной из первых реагирует на любые воздействия на организм. Как показано для *O. viverrini* (Sripa et al., 2011) и для *O. felinus* (Lvova et al., 2012), личинки паразитов вызывают, во-первых, механическое повреждение

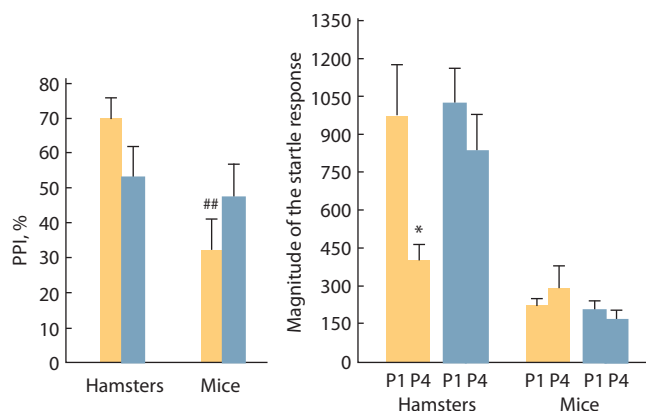


Fig. 5. Effect of *O. felinus* infection on prepulse inhibition (PPI) of the startle response to acoustic stimulation and magnitude of the startle response to the first (P1) and fourth (P4) stimuli in hamsters and mice. Yellow bars, control animals; blue bars, experimental animals; * $p < 0,05$, compared to P1; # $p < 0,01$, compared to the respective group of hamsters (Fisher LSD test and Student t test).

эпителия в желчных протоках печени и тканях в местах прикрепления ротовой и брюшной присосками. Во-вторых, они начинают выделять экскреторно-секреторные продукты, которые являются иммуногенными. Как было показано, экскреторно-секреторный продукт *O. felinus* содержит широкий спектр многофункциональных белков, модулирующих иммунные характеристики хозяина и вызывающих морфофункциональные патологические изменения в тканях (Львова и др., 2014). На этом фоне происходит активация макрофагов, тучных клеток, эозинофилов и других клеток иммунной системы хозяина, участвующих в механизмах гуморального и клеточного иммунитета (Степанова, Подклетнова, 2002; Новицкий и др., 2008; Lvova et al., 2012). С первых дней инфицирования наблюдаются динамические преобразования в печени, сопровождаемые повышением проницаемости сосудистых стенок и существенной инфильтрацией лейкоцитов (Бычков и др., 2008).

Как показало наше исследование, наибольшие изменения в составе форменных элементов крови на фоне инфицирования личинками *O. felinus* происходят у хомячков. Установлено значительное увеличение палочкоядерных и снижение сегментоядерных форм нейтрофилов. Это может отражать тяжесть патологического процесса в организме и свидетельствовать о повышении фагоцитарной функции, направленной на элиминацию поврежденных тканей хозяина, полученных при внедрении личинок *O. felinus* в эпителий желчных протоков, поскольку в норме палочкоядерные нейтрофилы присутствуют в периферической крови в небольшом количестве (1–6 %) (Кишкун, 2013). У мышей не было значительных изменений данных показателей.

В отличие от хомячков у мышей при заражении паразитами было обнаружено значительное повышение количества базофилов в крови. В норме базофилы содержатся в небольшом количестве и всего несколько часов (Кишкун, 2013). Гистамин — основной компонент базофилов,

который участвует в аллергических реакциях, поэтому повышение количества базофилов в крови связывают с проявлением аллергии. По-видимому, наблюдаемое повышение количества базофилов является специфической реакцией мышей в ответ на инфицирование. Помимо гистамина гранулы базофилов содержат большое количество серотонина, лейкотриенов, простагландинов и других медиаторов, вовлеченных в аллергические реакции и процессы воспаления. Возможно, повышение базофилов в крови мышей обеспечивает им большую устойчивость к инфицированию *O. felinus*.

В то же время повышение числа эозинофилов как у хомячков, так и у мышей является общей неспецифической реакцией организма в ответ на инвазии *O. felinus*. Аналогичное повышение числа эозинофилов у хомячков на 7-е–10-е сут после заражения наблюдали другие исследователи (Степанова, Подклетнова, 2002; Бычков и др., 2008). Повышенная эозинофилия на фоне заражения личинками *O. felinus* наблюдается и у людей (Бронштейн, Лучшев, 1998), причем у пациентов с острым описторхозом, в отличие от больных хроническим описторхозом, наблюдается наибольшее количество эозинофилов в крови (Литвинова и др., 2006). Обычно эозинофилия сопровождается различными паразитарными заболеваниями (Choi et al., 2003; Начева, Литягина, 2012).

В нашей работе установлено снижение числа лимфоцитов у инфицированных хомячков и отсутствие такового у мышей. Обращают на себя внимание значительные межвидовые различия по числу агранулоцитов у животных: у мышей в обоих случаях (контроль, опыт) лимфоцитов в крови больше, а моноцитов – меньше, чем у хомячков. К тому же у контрольных и опытных мышей наблюдалось увеличенное число тромбоцитов в крови, по сравнению с хомячками. Поскольку главная функция лимфоцитов – распознавание антигена и участие в иммунном ответе, а моноциты являются основным источником органо- и тканеспецифичных макрофагов (Кишкун, 2013), обладающих фагоцитарной функцией, можно предполагать, что у мышей существуют специфические механизмы защиты от чужеродных организмов, в том числе паразитов. При этом абсолютное содержание всех лейкоцитов в крови (агранулоциты + гранулоциты) мышей и хомячков было в обоих случаях приблизительно одинаковым.

Кроме того, у хомячков уже на стадии острого описторхоза прослеживаются возможные признаки анемии, что также подчеркивает меньшую устойчивость к инфицированию *O. felinus* у хомячков, чем у мышей. У них несколько снижен уровень гемоглобина и гематокрит, в то время как у мышей эти показатели остаются неизменными. Можно предположить, что вследствие заражения повышается скорость разрушения эритроцитов в селезенке хомячков. Возможно и другое объяснение, а именно: учитывая разную степень зрелости личинок *O. felinus* у представителей двух видов, можно предположить, что более развитые особи паразита в желчных протоках печени хомячков начинают интенсивнее питаться кровью хозяина. Недавно были получены первые результаты о том, что мариты *O. felinus* питаются кровью хозяина, при этом переводят гем в пигмент гемозин (темное содержимое в кишечнике паразита) (Lvova et al., 2016).

Развитие любого воспалительного процесса реализуется за счет эффекторных клеток крови (нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов), имеющих костномозговое происхождение. Изменение численности и функционального состояния лейкоцитов крови во многом свидетельствует об активности воспаления. Первые доказательства ответственности гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) за гемопоэтический гомеостаз в процессе формирования иммунных ответов были получены в 80-е годы прошлого столетия (Козлов и др., 1982). В последние годы продемонстрирована способность ГСК прямо и немедленно отвечать на воспалительные сигналы. Активация пролиферации и дифференцировки ГСК в ответ на инфекционный сигнал сопровождается мобилизацией более дифференцированных клеток из костного мозга в очаг воспаления (King, Goodell, 2011).

Для описторхоза характерно повышение экспрессии толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLRs) (Yongvanit et al., 2012). В последние годы показано, что ГСК экспрессируют TLRs, связывание TLR инициирует их вхождение в клеточный цикл, что стимулирует дифференцировку миелоидных предшественников (Megias et al., 2012). Кроме прямого TLR стимула, в миелоидной дифференцировке принимают участие провоспалительные цитокины: TNF, IFN I и II, IL-6 (Maltby et al., 2014). Таким образом, патоген-опосредованная стимуляция миелоидной дифференцировки может обеспечивать быстрое пополнение иммунных клеток в процессе формирования врожденных реакций на инфекцию.

Усиление костномозгового гемопоэза у хомячков может свидетельствовать о формировании ответа ГСК на инвазивное воздействие *O. felinus*. Наблюдается достоверное увеличение количества ранних (КОЕ-ГЭММ) и гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ) предшественников, пополняющих популяции гранулоцитов и макрофагов, расходуемых в процессе воспалительной реакции. Формирующаяся анемия (некоторое снижение гемоглобина и гематокрита) обуславливает, очевидно, стимуляцию эритропоэза (повышение количества эритроидных колоний).

В наших исследованиях на звуковой сигнал более выражено реагировали контрольные хомячки (по сравнению с контрольными мышами). При этом у инфицированных хомячков, в отличие от контрольных особей, не было реакции привыкания, что может свидетельствовать об определенных нарушениях в работе нервной системы. У людей усиленная стартл-реакция или отсутствие габитуации может быть следствием разнообразных заболеваний, затрагивающих нервную систему, например, посттравматический синдром у людей сопровождается повышением силы реакции и снижением скорости привыкания к стимулу, такие же изменения наблюдаются и при моделировании этого синдрома у крыс (Garrick et al., 2001; Marshall, Garakani, 2002). Что касается отсутствия реакции привыкания у мышей как контрольной, так и опытной групп, то, возможно, для выявления габитуации у данного вида животных четырех повторов оказалось просто недостаточно. Известно, что выраженность преимпульсного ингибирования стартл-реакции способны изменять многие фармакологические средства,

генетические мутации, психические и неврологические заболевания и некоторые другие факторы (Braff et al., 2001). Заражение личинками описторха не повлияло на величину ингибирования реакции вздрагивания, измеренную на сроке заражения 12 дней у мышей и хомячков. Однако не исключено, что при более длительном инфицировании экспериментальных животных (например, 6 мес.) нарушений будет существенно больше по многим показателям работы нервной системы.

Таким образом, в проведенном исследовании обнаружены существенные межвидовые различия уже на ранних стадиях инфицирования животных личинками *O. felineus*. Через две недели после инфицирования у хомячков наблюдались изменения в составе форменных элементов крови, свидетельствующие о проявлении воспалительных реакций в организме хозяина, вызванных инвазией. Одновременно с этим происходила активация гемопоэтических стволовых клеток-предшественников миелоидного и эритроидного ряда. Исследования реакции хомячков на акустический сигнал свидетельствуют о некоторых нарушениях в центральной нервной системе. Кроме того, более зрелые марины *O. felineus*, выделенные из желчных протоков хомячков, по сравнению с маридами, выделенными из мышей, также свидетельствуют о меньшей устойчивости хомячков к заражению. В отличие от хомячков, у мышей изменения в крови в ответ на инфицирование были менее выраженные и не сопровождалась увеличением гемопоэтической колониеобразующей активности и изменениями в реакции вздрагивания на акустический стимул. Полученные данные говорят о большей резистентности мышей к инфицированию *O. felineus*. Изучение причин устойчивости мышей к гельминтным инвазиям — предмет будущих исследований. На данном этапе можно определенно говорить о том, что острая стадия экспериментального описторхоза, более пролонгированная у мышей, не исключает возможности использования этого вида животных для моделирования *O. felineus*-индуцированного паразитоза.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 16-04-00356a and 15-04-03551a), the SB RAS Program for Research Collaboration (Integration Project 19), and State Budgeted Project 0324-2015-0004.

The authors are grateful to the Microscopy Center of ICG (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) for the access to the equipment and to colleagues of the Laboratory of Behavioral Neurogenomics, ICG, for the access to the “SR-Pilot” (San-Diego Instruments) device.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Adams A.M. Foodborne Trematodes. Foodborne Parasites. Ed. Y.R. Ortega. N.Y.: Springer Science + Business Media, LLC, 2006. Chap.7: 161-196.
Akhmedov V.A., Kritevich M.A. Chronic opisthorchiasis is a multiple-organ pathology. Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Uni-

versiteta. Seriya Biologiya, Clinicheskaya Medicina=Herald of Novosibirsk State University. Biology, Clinical Medicine. 2009;7(1): 118-121.
Bakhtanovskaya I.V., Stepanova T.F. An analysis of complex of biochemical parameters of liver functions in chronic opisthorchiasis. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni=Medical Parasitology and Parasitic Diseases. 2005;4:18-21.
Boonmars T., Boonjaraspinyo S., Kaewsamut B. Animal models for *Opisthorchis viverrini* infection. Parasitol. Res. 2009;104:701-703.
Braff D.L., Geyer M.A., Swerdlow N.R. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies Psychopharmacology. 2001;156:234-258.
Brazhnikova N.A., Tolkaeva M.V. Peculiarities of clinic, diagnostics and treatment of the opisthorchiasis liver abscesses. Annaly Khirurgicheskoy Gepatologii=Annals of Surgical Hepatology. 2000;5(1): 37-42.
Brazhnikova N.A., Tolkaeva M.V. Cancer of the liver, biliary tract and pancreas in chronic opisthorchiasis. Byulleten Sibirskoy Meditsiny=Bulletin of Siberian Medicine. 2002;2:71-76.
Bronstein A.M., Luchshev V.I. Trematode infections of the liver: opisthorchiasis and clonorchiasis. Russkiy Meditsinskiy Zhurnal=Russian Medical Journal. 1998;6(3):140-148.
Bychkov V.G., Krylov G.G., Sabirov A.Kh., Zuyevsky V.P., Khadiyeva Ye.D., Zhandekov Ye.D. Hepatic cell transformation changes in experimental opisthorchiasis. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni=Medical Parasitology and Parasitic Diseases. 2008;3:9-12.
Choi Y.K., Yoon B.I., Won Y.S., Lee C.H., Hyun B.H., Kim H.C., Oh G.T., Kim D.Y. Cytokine responses in mice infected with *Clonorchis sinensis*. Parasitol. Res. 2003;91(2):87-93.
D'Mello C., Swain M.G. Liver-brain inflammation axis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2011;301(5):G749-G61.
Garrick T., Morrow N., Shalev A.Y., Eth S. Stress-induced enhancement of auditory startle: an animal model of posttraumatic stress disorder. Psychiatry. 2001;64:346-354.
Geyer M.A., Braff D.L. Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animal models. Schizophrenia Bull. 1987;13(4):643-668.
Graham F. The more or less startling effects of weak prestimuli. Psychophysiology. 1975;12:238-248.
Hoffman H.S., Searle J.L. Acoustic and temporal factors in the evocation of startle. J. Acoust. Soc. Am. 1968;43:269-282.
Hung N.M., Madsen H., Fried B. Global status of fish-borne zoonotic trematodiasis in humans. Acta Parasitol. 2013;58(3):231-258.
Jittimane J., Sermswan R.W., Puapairoj A., Maleewong W., Wongratnacheewin S. Cytokine expression in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. Parasite Immunol. 2007;29(3): 159-167.
Keiser J., Utzinger J. Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. Trends Parasitol. 2007;23(11):555-562.
King K.Y., Goodell M.A. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. Nature. 2011;11:685-692.
Kishkun A.A. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. Uchebnoe posobie [Clinical Laboratory Diagnostics. Textbook]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2013.
Kozlov V.A., Zhuravkin I.N., Tsyrova I.G. Stvolovaya krovetvornaya kletka i immunnnyy otvet [Hematopoietic Stem Cell and Immune Response]. Novosibirsk, Nauka, 1982.
Labome.com. Laboratory Mice and Rats. Mat. Methods 2012;2:113. <http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>
Litvinova L.S., Kolobovnikova Yu.V., Knoutareva E.N., Grigoryeva E.S., Souvorova E.V., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. Cytotoxic potential of eosinophiles' granulocytes in patients having eosinophilia syndrome. Byulleten Sibirskoy Meditsiny=Bulletin of Siberian Medicine. 2006;3:26-31.

- Lvova M.N., Duzhak T.G., Tsentalovich Yu.P., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Secretome of the adult liver fluke *Opisthorchis felinus*. *Parazitologiya*=Parasitology (St.-Petersburg). 2014;48(3):169-184.
- Lvova M.N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. Comparative histopathology of *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):167-172.
- Lvova M.N., Zhukova M.V., Kiseleva E.V., Mayboroda O.A., Hensbergen P., Kizilova E.A., Besprozvannykh V.V., Sripa B., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Hemozoin in the gut contents of liver flukes (Opisthorchiidae family). *Int. J. Parasitol.* 2016;46:147-156. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.12.003>.
- Maksimova G.A., Zhukova N.A., Kashina E.V., Lvova M.N., Katokhin A.V., Tolstikova T.G., Ogorodova L.M., Kaminsky I.P., Sazonov A.E., Mordvinov V.A. Experimental model of opisthorchiasis in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Byulleten Sibirskoy Meditsiny*=Bulletin of Siberian Medicine. 2012;6:59-65.
- Maltby S., Hansbro N.G., Tay H.L., Stewart J., Plank M., Donges B., Rosenberg H.F., Foster P.S. Production and differentiation of myeloid cells driven by proinflammatory cytokines in response to acute pneumovirus infection in mice. *J. Immunol.* 2014;193(8):4072-4082.
- Mairiang E., Laha T., Bethony J.M., Thinkhamrop B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Tesana S., Loukas A., Brindley P.J., Sripa B. Ultrasonography assessment of hepatobiliary abnormalities in 3359 subjects with *Opisthorchis viverrini* infection in endemic areas of Thailand. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):208-211.
- Marshall R.D., Garakani A. Psychobiology of the acute stress response and its relationship to the psychobiology of post-traumatic stress disorder. *Psychiat. Clin. N. Am.* 2002;25(2):385-395.
- Megías J., Yáñez A., Moriano S., O'Connor J.E., Gozalbo D., Gil M.L. Direct Toll-like receptor-mediated stimulation of hematopoietic stem and progenitor cells occurs in vivo and promotes differentiation toward macrophages. *Stem Cells.* 2012;30(7):1486-1495.
- Mordvinov V.A., Furman D.P. The Digenea parasite *Opisthorchis felinus*: a target for the discovery and development of novel drugs. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2010;10(5):385-401.
- Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):25-31.
- Nacheva L.V., Lityagina A.V. Cellular reactions in helminthiasis. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal*=Russian Journal of Parasitology. 2012;3:80-86.
- Novitsky V.V., Ryazantseva N.V., Litvinova L.S., Tkachenko S.B., Kolobovnikova Yu.V., Lepekhin A.V., Chernyshova N.P., Grigoryeva E.S., Suvorova E.V., Zima A.P. Change in the production of key cytokines for regulation eosinophilic granulocytes in *Opisthorchis felinus* invasion. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*=Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2008;2:38-42.
- Ogorodova L.M., Freidin M.B., Sazonov A.E., Fedorova O.S., Gerbek I.E., Cherevko N.A., Lebedeva N.Y. A pilot screening of prevalence of atopic states and opisthorchosis and their relationship in people of Tomsk Oblast. *Parasitol. Res.* 2007;101(4):1165-1168.
- Paylor R., Crawley J.N. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. *Psychopharmacology.* 1997;132:169-180.
- Pozio E., Armignacco O., Ferri F., Gomez Morales M.A. *Opisthorchis felinus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union. *Acta Trop.* 2013;126(1):54-62.
- Prokopenko V.D., Volina E.G. *Struktura i funktsii immunnogo sistema cheloveka* [Structure and function of the human immune system.]. Moscow, RUDN, 2001.
- Schuster R., Dell K., Nöckler K., Vöster J., Schwartz-Porsche D., Haidler W. Liver enzyme activity and histological changes in the liver of silver foxes (*Vulpes vulpes fulva*) experimentally infected with *opisthorchiid* liver flukes. A contribution to the pathogenesis of opisthorchiidosis. *Parasitol. Res.* 2003;89(5):414-418.
- Sripa B., Bethony J.M., Sithithaworn P., Kaewkes S., Mairiang E., Loukas A., Mulvenna J., Laha T., Hotez P.J., Brindley P.J. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop.* 2011;120(Suppl. 1):S158-S168.
- Sripa B., Kaewkes S. Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. *Parasite Immunol.* 2000;22(3):139-145.
- Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Mairiang E., Laha T., Smout M., Pairojkul C., Bhudhisawasdi V., Tesana S., Thinkamrop B., Bethony J.M., Loukas A., Brindley P.J. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med.* 2007;4(7):e2011148-1155.
- Sripa B., Thinkamrop B., Mairiang E., Laha T., Kaewkes S., Sithithaworn P., Periago M.V., Bhudhisawasdi V., Yonglithipagon P., Mulvenna J., Brindley P.J., Loukas A., Bethony J.M. Elevated plasma IL-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(5):e1654:1-9.
- Stepanova T.F., Bakshtanovskaia I.V., Skichko S.I. Parameters of thyroid status in patients with acute and superinvasion opisthorchiasis. *Fundamentalnye issledovaniya*=Fundamental research. 2004;6:103-104.
- Stepanova T.F., Podkletnova L.F. Parazitotsenoticheskie aspekty invazionno-infektsionnoy patologii (opisthorkhoz i tuberkulez) [Parasitecoenotic aspects of invasive- infected pathology (opisthorchiasis and tuberculosis)]. Tyumen: TGU, 2002.
- Yongvanit P., Thanan R., Pinlaor S., Sithithaworn P., Loilome W., Namwat N., Techasen A., Dechakhamphu S. Increased expression of TLR-2, COX-2, and SOD-2 genes in the peripheral blood leukocytes of opisthorchiasis patients induced by *Opisthorchis viverrini* antigen. *Parasitol. Res.* 2012;110(5):1969-1977.
- Zelentosov A.G. Susceptibility of inbred mice to helminths. II. Development of *Opisthorchis felinus* in mice of strains A/He, CBA/Lac, CC57w/MJ, C57BL/LJ, DBA/2J and SWR. *J. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*=Medical Parasitology and Parasitic Diseases. 1974;43(1):95-98.



Влияние однократного введения этанола на поведение, его потребление и предпочтение у крыс, селекционируемых на ручное и агрессивное поведение по отношению к человеку

Р.В. Кожемякина¹✉, С.Г. Шихевич¹, А. Каган², Р.Г. Гулевич¹

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

² Институт Макса Планка эволюционной антропологии, Лейпциг, Германия

Согласно гипотезе о снятии напряжения, повышенный уровень тревожности или стресса может приводить к большему потреблению алкоголя и алкогольной зависимости. Однако это не всегда подтверждается данными, полученными на экспериментальных животных. Одной из моделей для исследования связи между тревожностью, функцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) и предрасположенностью к алкогольной зависимости может быть селекционная модель серых крыс с ручным и агрессивным поведением по отношению к человеку. Ранее у ручных крыс отмечали ослабление тревожно-подобного поведения и понижение функциональной активности ГГНС, судя по уровню кортикостерона и адренотропного гормона (АКТГ) в крови в условиях покоя и при стрессе по сравнению с агрессивными и неселекционируемыми животными. В данной работе оценивали предпочтение и потребление этанола разной концентрации в условиях свободного доступа к этанолу и воде (two bottle-choice paradigm), а также влияние однократного введения этанола на поведение в приподнятом крестообразном лабиринте у самцов крыс с агрессивным и ручным поведением. У ручных и агрессивных самцов после внутрибрюшинного введения алкоголя отмечали уменьшение числа вертикальных стоек в центре приподнятого крестообразного лабиринта, которое достигало уровня значимости только у первых. Такое изменение свидетельствует не только об отсутствии анксиолитического действия 12 %-го этанола, но и усилении тревожно-подобного поведения у ручных крыс. Агрессивные крысы превосходили ручных по потреблению 2 %-го этанола, тогда как потребление 10 %-го и предпочтение 5 %-го раствора у ручных было достоверно выше, чем у агрессивных. После семидневной отмены спирта у ручных крыс наблюдали эффект депривации, поскольку его потребление становилось больше, чем до отмены. Таким образом, различия в потреблении этанола между ручными и агрессивными крысами меняются в зависимости от концентрации раствора. Агрессивные самцы пьют только 2 %-й раствор больше, чем ручные, и поэтому гипотеза о снятии напряжения подтверждается именно для этой концентрации.

Ключевые слова: этанол; отбор по поведению; ручные и агрессивные крысы; тревожно-подобное поведение; приподнятый крестообразный лабиринт; эффект депривации.

Effect of single ethanol administration on behavior and the consumption and preference of ethanol in tame and aggressive rats

R.V. Kozhemyakina¹✉, S.G. Shikhevich¹, A. Cagan², R.G. Gulevich¹

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

² Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany

According to the hypothesis of stress relief, a high level of anxiety or stress may cause greater alcohol consumption and alcohol addiction. However, data obtained with experimental animals do not always confirm this statement. Model strains of Norway rats selected for tame and aggressive attitude to humans are some of the models for investigation of relationships among anxiety, the function of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis, and predisposition to alcohol addiction. Former studies of tame rats, based on the blood levels of corticosterone and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in rest and stress, revealed a decrease of the manifestation of anxiety-like behavior and of the HPA function in comparison to aggressive and unselected rats. This work assesses the preferred consumption of ethanol at various concentrations with free access to ethanol and water (two bottle-choice paradigm) and the effect of acute ethanol administration on the behavior of aggressive and tame male rats in an elevated plus maze. After intraperitoneal alcohol administration, tame and aggressive males showed a reduced number of rearings in the center of the elevated plus maze, but the reduction was statistically significant only in the former. It pointed not only to the absence of an anxiolytic action of 12 % ethanol but also to enhancement of anxiety-like behavior in tame rats. After seven-day alcohol withdrawal, tame rats showed signs of deprivation, because the alcohol consumption was greater than before the withdrawal. Thus, the difference between tame and aggressive rats in alcohol consumption

varies with alcohol concentration. Aggressive males drank more alcohol than water only at the 2 % concentration. Hence, the hypothesis of stress relief is confirmed only for this concentration.

Key words: ethanol; selection for behavior; tame and aggressive rats; anxiety-like behavior; elevated plus maze; effect of deprivation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кожемякина Р.В., Шихевич С.Г., Каган А., Гулевич Р.Г. Влияние однократного введения этанола на поведение, его потребление и предпочтение у крыс, селекционируемых на ручное и агрессивное поведение по отношению к человеку. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):165-171. DOI 10.18699/VJ16.147

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kozhemyakina R.V., Shikhevich S.G., Cagan A., Gulevich R.G. Effect of single ethanol administration on behavior and the consumption and preference of ethanol in tame and aggressive rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):165-171. DOI 10.18699/VJ16.147

Известно, что социальный стресс, вызванный конфликтами в семье или на работе, чаще, чем другие виды стресса, провоцирует потребление алкоголя и оказывает наиболее стойкий эффект на аддиктивное (зависимое) поведение (de Wit et al., 2003; Kudryavtseva et al., 2006; Thomas et al., 2011). Глюкокортикоиды как основные гормоны стресса, взаимодействуя с мезолимбической системой, опосредуют стресс-индуцированное потребление алкоголя (Spanagel et al., 2014). Согласно гипотезе о снятии напряжения, индивидуумы с повышенной тревожностью могут быть более чувствительны к анксиолитическому действию алкоголя и, возможно, поэтому более предрасположены к его потреблению (Conger, 1956). Однако эта гипотеза не всегда подтверждается экспериментально. В частности показано, что у крыс Wistar, селекционированных на повышенную тревожность (high anxiety behavior, HAB), потребление и предпочтение этанола ниже, чем у животных контрастной линии (low anxiety behavior, LAB) (Henniger et al., 2002).

По мнению ряда авторов, критическим механизмом аддиктивного поведения является индуцированное алкоголем повышение дофамина в прилежащем ядре (nucleus accumbens), входящем в мезолимбическую систему мозга (Comings, Blum, 2000; Blum, Oskar-Berman, 2014). Поскольку дофамин влияет на чувство удовольствия и подавляет стрессорное состояние, то самолечение алкоголем приводит к временному облегчению дискомфорта и ложному ощущению благополучия. Однако хроническое злоупотребление алкоголем и других психоактивных веществ приводит к подавлению синтеза этого нейротрансмиттера и рецепторной дисфункции (Comings, Blum, 2000).

Для исследования генетических и нейробиологических механизмов алкоголизма методом отбора в нескольких лабораториях были созданы модельные линии крыс, различающиеся по предпочтению к этанолу (Stewart et al., 1993; Colombo et al., 1995; Möller et al., 1997). Однако практически нет данных по потреблению алкоголя у животных, селекционированных по социально значимым признакам поведения, к которым следует отнести и реакцию на социальный стресс. В связи с этим имеющиеся в ИЦиГ СО РАН уникальные линии серых крыс, в течение длительного периода (80 поколений) отбираемых по реакции на человека, а именно на агрессивное и толерантное (спокойное) отношение к человеку, могут служить адекватной моделью для исследования генетически

детерминированных особенностей потребления алкоголя и аддиктивного поведения. Ранее проведенные исследования показали, что отбор крыс по реакции на человека сопровождается изменением широкого спектра физиологических и поведенческих параметров (Plyusnina, Oskina, 1997; Albert et al., 2008). Так, у спокойных (ручных) крыс наблюдали понижение функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), ослабление тревожно-подобного поведения и внутривидовой агрессии в тесте «резидент-интродер», а также более продолжительный латентный период агрессивных столкновений в тесте социальных взаимодействий по сравнению с агрессивными и неселекционируемыми животными (Naumenko et al., 1989; Plyusnina et al., 2011; Gulevich et al., 2015). При отборе крыс на спокойное поведение отмечали изменение уровня дофамина, а также плотности и связывающей способности рецепторов дофамина в мезолимбической системе мозга по сравнению с неселекционированными животными (Nikulina et al., 1992). По данным исследователей из Лейпцига, уровень дофамина в прилежащем ядре у ручных крыс выше, чем у агрессивных (Albert et al., 2008). В последнее время было показано, что экспрессия мРНК гена дофаминовых рецепторов (DRD2) в миндале у ручных крыс выше, чем у агрессивных и неселекционированных крыс.

Поскольку отбор крыс по реакции на человека влияет на ГГНС и дофаминергическую систему в мезолимбических структурах мозга, т. е. системы, которые опосредуют и стресс-индуцированное потребление алкоголя, можно было предполагать, что спокойные и агрессивные крысы будут отличаться по эффекту этанола на поведение и его потреблению.

Целью данной работы было исследовать потребление и предпочтение этанола, а также его влияние на поведение у самцов крыс, селекционируемых в двух разных направлениях по отношению к человеку.

Материалы и методы

Животные

Эксперименты проводили на половозрелых самцах аутбредных серых крыс (*Rattus norvegicus*) 83-го поколения отбора, селекционированных на отсутствие (линия ручных) и усиление (линия агрессивных) агрессивности по отношению к человеку. В каждой экспериментальной

группе было по 10–12 особей. Животных содержали в металлических клетках ($50 \times 33 \times 20$ см) в группах по четыре особи при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. До экспериментов самцов взвешивали и рассаживали по одному. Исследования проводили по схеме, применяемой для Wistar крыс, селекционированных по уровню тревожности (Henniger et al., 2002), и модифицированной для клеток, в которых содержались серые крысы, в виварии ИЦиГ СО РАН. Эксперименты были выполнены в соответствии с правилами проведения работ на экспериментальных животных (приложение к приказу Министерства здравоохранения № 267 от 19.06.2003).

Тест приподнятого крестообразного лабиринта

Тестирование по поведению проводили с 14:00 до 18:00 местного времени. За 10 мин до тестирования самцам вводили внутривенно 12 %-й раствор этанола (1 г/кг). Контрольным животным вводили физиологический раствор.

Для исследования эффекта алкоголя на поведение использовали тест приподнятого крестообразного лабиринта, который широко используется для анксиолитических и анксиогенных свойств препаратов (Rodgers, Cole, 1994). Лабиринт представляет собой крестообразную платформу, приподнятую над полом на 50 см. Он состоит из расположенных друг напротив друга двух открытых и двух закрытых рукавов размером 50×10 см. Закрытые рукава окружены с трех сторон непрозрачными стенками высотой 40 см. На пересечении рукавов располагается центральная платформа размером 10×10 см. В начале теста крысу помещали в центр лабиринта, носом к закрытому рукаву. В течение 5 мин определяли параметры теста: латентные периоды захода в закрытые и выходы в открытые рукава; число заходов и время нахождения в открытых рукавах лабиринта; число заходов и время нахождения в закрытых рукавах лабиринта; число выходов в центр; время нахождения в центре лабиринта; число и время «выглядывания» (выход двумя лапами) в центр и в открытые рукава. Лабиринт после каждой крысы тщательно мыли и высушивали салфетками.

Поведение регистрировали на видеокамеру и в последующем обрабатывали с помощью программы, разработанной в лаборатории, которая позволяла оценить время каждого поведенческого паттерна (Плюснина и др., 2003).

Определение потребления и предпочтения этанола в условиях свободного доступа (two bottle test)

Спустя пять дней после тестирования по поведению на каждую клетку подвешивали по две бутылки с водой и спиртом. Размеры клеток не позволяли одновременно подвешивать четыре бутылки (одну с водой и три бутылки с разной концентрацией этанола), как в исследовании на крысах Wistar (Henniger et al., 2002). Каждые один–два дня обе бутылки взвешивали и меняли местами. В течение первых пяти дней в бутылках был 2 %-й раствор, в следующие пять дней – 5 %-й и последние пять дней – 10 %-й раствор. Далее для регистрации эффекта депривации бутылки со спиртом убирали, а через семь дней их вновь ставили с 10 %-м спиртом и продолжали взвешивать в течение двух дней. Потребление алкоголя считали в г/кг,

а предпочтение – в процентах от общего количества потребляемой жидкости.

Статистическую обработку данных проводили с помощью двухфакторного дисперсионного комплекса (ANOVA), в котором одним из факторов была линия крыс, а другим – влияние этанола, вводимого внутривенно (для поведенческого теста), или его концентрация, дни предъявления и депривация (для эксперимента со свободным доступом к воде и спирту). Различия между группами определяли с помощью критерия Fisher post-hoc.

Результаты

Влияние однократного введения этанола на тревожно-подобное поведение показано на рис. 1. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние генотипа на суммарное время, проведенное животными в центре ($F_{1,38} = 15,65, p < 0,001$) и закрытых рукавах ($F_{1,38} = 6,43, p < 0,05$), тогда как введение этанола не влияло на эти показатели ($F_{1,38} = 1,74, p > 0,05$ и $F_{1,38} = 1,60, p > 0,05$) соответственно (рис. 1, а, б). Взаимодействие этих факторов было недостоверно для суммарного времени, проведенного как в центре ($F_{1,38} = 0,22, p > 0,05$), так и в закрытых рукавах ($F_{1,38} = 1,52, p > 0,05$). Ручные самцы из контрольной группы меньше времени проводят в закрытых рукавах, чем агрессивные ($p < 0,05$), тогда как после внутривенного введения этанола эти различия сглаживаются (рис. 1, б).

Факторы генотипа и введения этанола не влияли на число выходов в центр ($F_{1,38} = 0,07, p > 0,05$ и $F_{1,38} = 0,12, p > 0,05$) соответственно (рис. 1, в), тогда как взаимодействие этих факторов было достоверно ($F_{1,38} = 4,86, p < 0,05$). Эти факторы также не влияли на число выходов в открытые рукава ($F_{1,38} = 1,58, p > 0,05$ и $F_{1,38} = 0,004, p > 0,05$) соответственно (рис. 1, г), а взаимодействие факторов было достоверно ($F_{1,38} = 5,53, p < 0,05$). Число выходов в открытые рукава у агрессивных и ручных самцов в контрольной группе не отличалось, а после введения этанола ручные крысы реже выходили в открытые рукава, чем агрессивные ($p < 0,05$), (рис. 1, г).

Обнаружено влияние генотипа и введения этанола на число вертикальных стоек в центре $F_{1,38} = 4,64, p < 0,05$ и $F_{1,38} = 8,70, p < 0,01$ соответственно (рис. 1, д), взаимодействие этих факторов было недостоверно $F_{1,38} = 0,21, p > 0,05$. У самцов обоих генотипов после введения этанола отмечали уменьшение этого параметра по сравнению с контролем, которое достигало уровня значимости у ручных крыс ($p < 0,05$) и было на грани достоверности ($p = 0,08$) у агрессивных.

На рис. 2 представлены результаты по потреблению этанола различной концентрации в среднем за один день в условиях свободного выбора спирта и воды. Двухфакторный дисперсионный анализ не выявил влияния генотипа на этот параметр ($F_{1,66} = 0,27, p > 0,05$), тогда как фактор концентрации этанола достоверно влиял на его потребление ($F_{2,66} = 31,11, p < 0,001$). Взаимодействие этих факторов было недостоверно ($F_{2,66} = 2,51, p > 0,05$). Потребление 2 % и 5 %-го растворов этанола не отличалось у крыс с разным поведением, тогда как потребление 10 %-го этанола у ручных крыс было выше, чем у агрессивных.

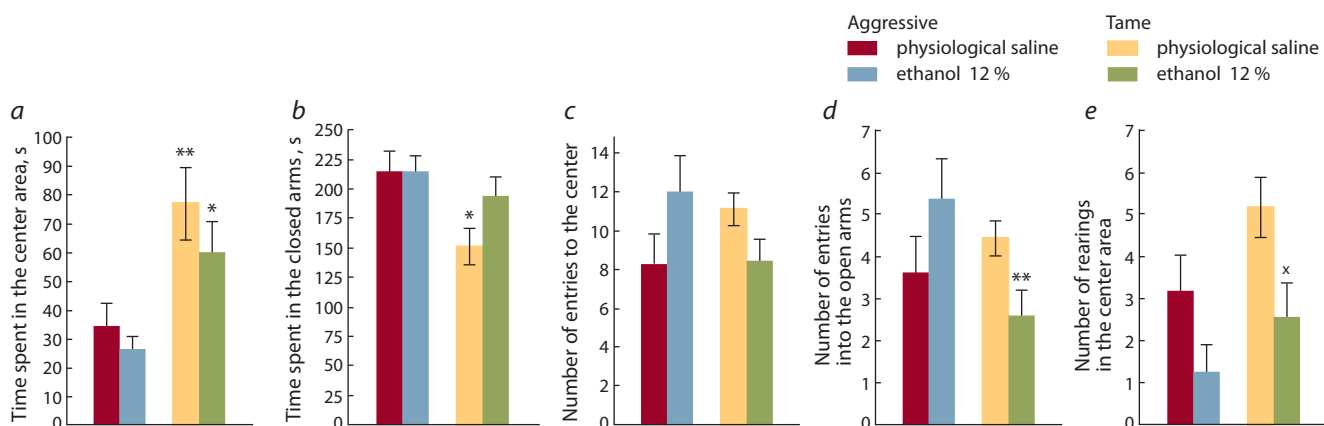


Fig. 1. Effect of ethanol on the behavior in the elevated plus maze.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to the corresponding groups of aggressive males; $x p < 0.05$, compared to control animals treated with physiological saline.

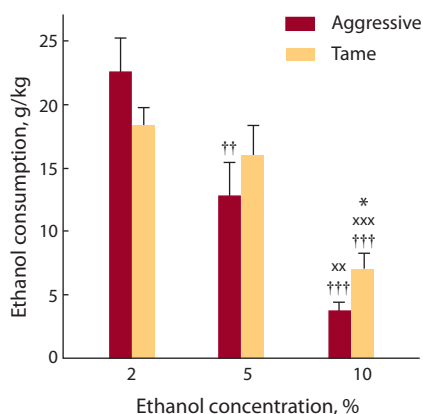


Fig. 2. Consumption of different ethanol concentrations within five days of presentation (daily average).

* $p < 0.05$, compared to aggressive; ††† $p < 0.001$; †† $p < 0.01$, compared to 2% ethanol in the corresponding group; xxx $p < 0.001$; xx $p < 0.01$, compared to 5% ethanol in the corresponding group.

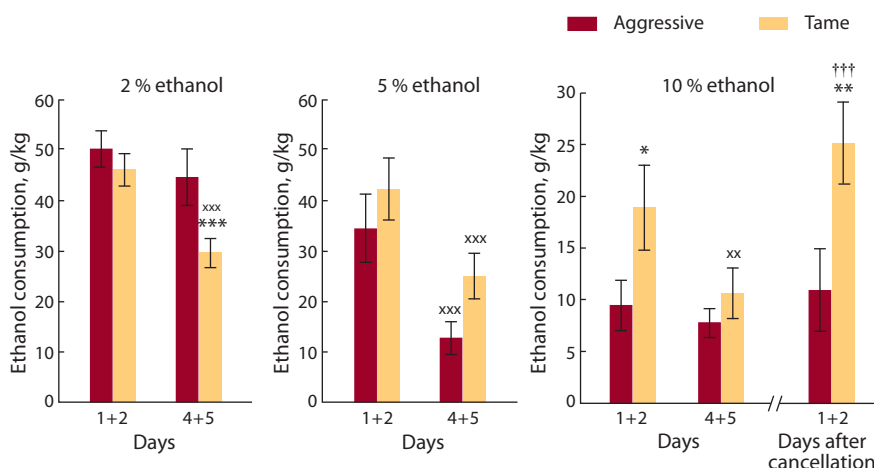


Fig. 3. Ethanol consumption within the first two days, within days 4 and 5 of its presentation, and within the first two days after 7-day cancellation.

*** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, compared to the aggressive group in the corresponding days; xxx $p < 0.001$; xx $p < 0.01$, compared to the first two days in the corresponding group; ††† $p < 0.001$, compared to the 4–5 days in the corresponding group.

На рис. 3 представлены данные по потреблению этанола с разной концентрацией в первые два дня и на 4-й–5-й дни предъявления, а также за два дня после семидневной отмены. На потребление 2%-го этанола влияли как генотип ($F_{1,20} = 11,53$, $p < 0,01$), так и дни его предъявления ($F_{1,20} = 10,12$, $p < 0,01$), взаимодействие этих факторов было достоверно ($F_{1,20} = 15,46$, $p < 0,001$). На потребление 5%-го этанола генотип не влиял ($F_{1,22} = 1,93$, $p > 0,05$), но влияли дни предъявления ($F_{1,22} = 37,74$, $p < 0,001$), а взаимодействие этих

факторов было незначительно ($F_{1,22} = 0,53$, $p > 0,05$). Аналогично генотип не влиял на потребление 10%-го этанола ($F_{1,21} = 3,93$, $p > 0,05$), но влияли дни предъявления ($F_{1,22} = 37,74$, $p < 0,001$), взаимодействие этих факторов было также незначительно ($F_{1,22} = 0,53$, $p > 0,05$).

Кроме того, обнаружено влияние факторов генотипа ($F_{1,44} = 7,40$, $p < 0,01$) и депривации ($F_{1,44} = 7,96$, $p < 0,01$) на потребление 10%-го этанола, тогда как взаимодействие этих факторов было незначительно ($F_{1,44} = 3,30$, $p > 0,05$).

У ручных крыс потребление 2%-го этанола на 4-й–5-й дни предъявления снижалось по сравнению с первыми днями и становилось меньше, чем у агрессивных (рис. 3). Потребление 5%-го этанола на 4-й–5-й дни предъявления снижалось как у ручных, так и агрессивных крыс, по сравнению с первыми днями. Ручные крысы достоверно превосходили агрессивных по потреблению 10%-го этанола в первые дни предъявления ($p < 0,05$), на 4-й–5-й дни предъявления потребление этанола у них снижалось ($p < 0,01$), а у агрессивных существенно не изменялось. В первые два дня после 7-дневной отмены

потребление 10 %-го этанола у ручных крыс повышалось по сравнению с потреблением на 4-й–5-й дни до отмены ($p < 0,001$), тогда как у агрессивных существенно не изменялось. Потребление 10 %-го этанола после отмены у ручных крыс, как и в первые дни предъявления, оставалось повышенным по сравнению с агрессивными ($p < 0,01$).

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние генотипа и концентрации этанола на его предпочтение ($F_{1,66} = 12,48, p < 0,001$) и ($F_{2,66} = 35,51, p < 0,001$) соответственно (рис. 4). Взаимодействие факторов было недостоверно ($F_{2,66} = 1,22, p > 0,05$). У агрессивных крыс по мере повышения концентрации этанола предпочтение к нему достоверно понижается, тогда как у ручных этот показатель не отличается для 2 %-го и 5 %-го растворов, и уменьшается только для 10 %-го этанола. Предпочтение к 2 %-му раствору у ручных и агрессивных крыс не отличается, тогда как предпочтение к 5 %-му раствору у ручных крыс выше, чем у агрессивных ($p > 0,01$), такая же тенденция отмечается и по предпочтению к 10 %-му раствору ($p = 0,06$).

Обсуждение

При сравнении результатов по предпочтению этанола разной концентрации можно отметить, что у ручных и агрессивных крыс максимальный уровень приходится на 2 %-й раствор (рис. 4). Эти результаты согласуются с данными других авторов о предпочтении крысами раствора алкоголя с концентрацией менее 6 % (Meisch, Lemaire, 1993) или 5 %-го раствора по сравнению с 10 %-м и 20 %-м растворами (Henniger et al., 2002). Предпочтение к 2 %-му раствору у ручных и агрессивных крыс не отличается, тогда как предпочтение к 5 %-му раствору у ручных крыс выше, чем у агрессивных. У агрессивных крыс предпочтение раствора этанола обратно пропорционально его концентрации, а у ручных – достоверно снижается на 10 %-м растворе этанола.

Среднее потребление этанола за день так же, как и его предпочтение, у агрессивных крыс достоверно уменьшается по мере повышения концентрации (см. рис. 2, 4), в то время как у ручных крыс потребление 2 %-го и 5 %-го растворов существенно не отличается, а 10 %-го раствора становится меньше, чем растворов с более низкими концентрациями. На основании этих данных по предпочтению и потреблению этанола разной концентрации можно предполагать, что агрессивные крысы более чувствительны к изменению концентрации этанола от 2 до 5 %, чем ручные.

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о повышенном потреблении 2 %-го этанола агрессивными крысами на 4-й–5-й дни предъявления по сравнению с ручными животными (см. рис. 3). Ранее было показано, что для агрессивных крыс характерна повышенная тревожность, судя по поведению в светло-темной камере и амплитуде вздрагивания (startle-response) (Albert et al., 2008). Согласно гипотезе о снятии напряжения, индивидуумы с повышенной тревожностью могут быть более чувствительны к анксиолитическому действию алкоголя и, возможно, поэтому более предрасположены к его потреблению (Conger, 1956). Поэтому можно предполагать, что анксиолитический эффект этанола в большей степени проявляется у агрессивных крыс и поэтому его потребление у них больше, чем у ручных. Однако это предположение можно отнести только к 2 %-му раствору этанола, поскольку результаты потребления спирта с более высокими концентрациями его не подтверждают. Так, у агрессивных крыс наблюдали пониженное предпочтение к 5 %-му раствору и потребление 10 %-го раствора этанола в первые два дня предъявления и в среднем за один день, а также после семидневной отмены по сравнению с ручными самцами. Причем у последних отмечали эффект депривации, так как потребление 10 %-го этанола после отмены становилось больше, чем до отмены.

Эти результаты согласуются с данными о большем потреблении этанола крысами, селекционированными на пониженную (LAB) тревожность в тесте приподнятого крестообразного лабиринта по сравнению с животными контрастной линии (HAB) (Henniger et al., 2002). Выше уже упоминалось, что ручные крысы проявляют меньшую тревожность, чем агрессивные (Albert et al., 2008). Однако, в отличие от ручных крыс, у самцов с понижен-

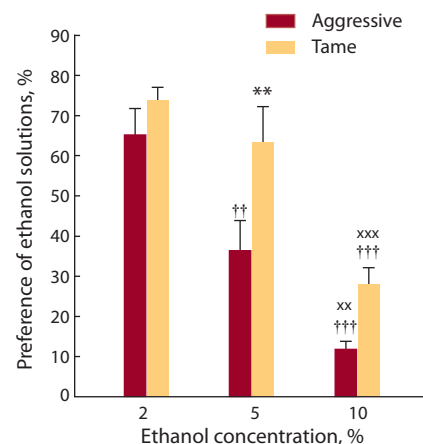


Fig. 4. Preference of ethanol solutions with different concentrations presented for five days (percentage of the total amount of consumed liquid).

** $p < 0,01$, compared to the respective aggressive group; ††† $p < 0,001$; †† $p < 0,01$, compared to 2% ethanol in the corresponding group; xxx $p < 0,001$; xx $p < 0,01$, compared to 5% ethanol in the corresponding group.

ной тревожностью (LAB) отмечают повышенную межсамцовую агрессию в тесте «резидент–интродер» по сравнению с самцами контрастной линии (Veenema, Neumann et al., 2007). Кроме того, схема нашего эксперимента отличалась от схемы на крысах линий HAB и LAB. Если в нашем эксперименте крысы имели доступ к двум бутылкам с водой и спиртом разной концентрации (2, 5 и 10 %), то в исследовании на HAB и LAB крысах доступ был одновременно к четырем бутылкам с водой и спиртом 5, 10 и 20 % (Henniger et al., 2002). Несмотря на различия между схемами экспериментов и моделями крыс, селекционируемых по реакции на человека и уровню тревожности, результаты свидетельствуют о повышенном потреблении алкоголя у самцов с пониженной тревожностью по сравнению с животными соответствующих контрастных линий. Полученные нами данные подтверждают точку зрения других авторов о том, что положительная связь между тревожностью и потреблением спирта в условиях домашней клетки отмечается только с низкими его концентрациями (2–4 %), и сами эти условия не способствуют тревожно-подобному поведению (Henniger et al., 2002).

Как у менее тревожных (LAB), так и ручных крыс понижена реакция ГГНС на несоциальный стресс по сравнению с соответствующими контрастными линиями (Veenema, Neumann et al., 2007; Оськина и др., 2008). Базальные уровни дофамина в прилежащем ядре (NAcc) не отличались у крыс с пониженной тревожностью (LAB) и неселекционированных, тогда как после теста «резидент–интродер» уровень дофамина у первых становился выше, чем у последних (Beiderbeck et al., 2012). Среди девяти исследуемых районов мозга у крыс, селекционированных по реакции на человека, только в NAcc найдены различия по уровню дофамина, который у ручных был выше, чем у агрессивных (Albert et al., 2008). В связи с этими данными можно предполагать, что в процессе отбора крыс на ручное поведение формируются определенные взаимосвязи между ГГНС и дофаминергической системой мезолимбических структур мозга, которые способствуют повышенному потреблению и предпочтению этанола (с концентрацией более 5 %) по сравнению с агрессивными животными.

При тестировании в приподнятом крестообразном лабиринте ручные самцы из контрольной группы меньше времени проводят в закрытых рукавах, чем агрессивные, тогда как после внутрибрюшинного введения этанола эти различия сглаживаются. По числу выходов в открытые рукава, наоборот, в контрольной группе достоверных различий нет, а после введения этанола ручные крысы реже выходят в открытые рукава, чем агрессивные. В результате сопоставления этих результатов у крыс разного поведения можно косвенно судить о повышении тревожности у ручных крыс под влиянием введения этанола, тогда как прямым свидетельством этого является достоверное уменьшение числа вертикальных стоек в центре у ручных крыс после введения этанола по сравнению с контролем. Следовательно, 12 %-й этанол не только не оказывает анксиолитического действия у ручных крыс, но и вызывает усиление тревожно-подобного поведения. В связи с этим серые крысы с ручным поведением могут служить моделью для исследования алкоголь-индуцированного повышения тревожности. Можно предполагать, что такая реакция у ручных крыс, вызванная этанолом, способствует его дальнейшему потреблению.

Среди генов, отличающихся по структуре у серых крыс, селекционированных на ручное и агрессивное поведение, наши коллеги из Германии, в частности, отметили ген *ANKK1* (ankyrin repeat and kinase domain containing 1). Мутации в этом гене были найдены только у ручных крыс и не встречались у агрессивных и неселекционированных. Ген *ANKK1* тесно сцеплен с геном рецептора дофамина (*DRD2*) и экспрессируется в астроцитах, а *ANKK1* белок относят к семейству киназ, участвующих в сигнальной трансдукции (Neville et al., 2004). Апоморфин, действующий как агонист дофаминовых рецепторов, активирует экспрессию гена *ANKK1* в культуре мышечных астроцитов, что свидетельствует о его возможной связи с дофаминергической системой (Hoenicka et al., 2010). У человека полиморфизм, известный как Taq 1A, в гене *ANKK1* (или *DRD2*, как ранее считали) активно исследуют в связи с аддиктивным, антисоциальным поведением (Hoenicka et al., 2010; Lu et al., 2012) и связывают с такими по-

веденческими особенностями, как склонность к поиску новизны (novelty seeking) и избеганию опасности (harm avoidance) (Berman et al., 2002). Кроме того, показано, что Taq 1A полиморфизм модулирует плотность и связывающую способность рецепторов *DRD2* (Ariza et al., 2012). Как уже отмечено выше, при отборе крыс на ручное поведение изменяются уровень дофамина, а также плотность и связывающая способность рецепторов дофамина в мезолимбической системе мозга по сравнению с неселекционированными животными (Nikulina et al., 1992). По данным исследователей из Лейпцига, уровень дофамина в прилежащем ядре у ручных крыс выше, чем у агрессивных (Albert et al., 2008). Возможно, структурные изменения в гене *ANKK1*, найденные у ручных крыс, влияют на экспрессию гена дофаминовых рецепторов *DRD2*, что и приводит к повышенному предпочтению и потреблению раствора этанола с концентрацией более 5 %.

Таким образом, различия в потреблении этанола между ручными и агрессивными крысами меняются в зависимости от концентрации раствора. Агрессивные самцы пьют больше, чем ручные, только 2 %-й раствор, и поэтому гипотеза о снятии напряжения подтверждается лишь для этой концентрации.

Acknowledgments

This study was supported by the federal budget, State Project no. 0324-2015-0004 and done in cooperation with the Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Albert F.W., Shchepina O., Winter C., Römpler H., Teupser D., Palme R., Ceglarek U., Kratzsch J., Sohr R., Trut L.N., Thierry 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;53:413-421. DOI 10.1016/j.yhbeh.2007.11.010
- Ariza M., Garolera M., Jurado M.A., Garcia-Garcia I., Hernan I., Sanchez-Garre C., Vernet-Vernet M., Sender-Palacios M.J., Marques-Iturria I., Pueyo R., Segura B., Narberhaus A. Dopamine genes (*DRD2/ANKK1-TaqA1* and *DRD4-7R*) and executive function: their interaction with obesity. *PLoS One.* 2012;7(7):e41482. DOI 10.1371/journal.pone.0041482
- Beiderbeck D.I., Reber S.O., Havasi A., Bredewold R., Veenema A.H., Neumann I.D. High and abnormal forms of aggression in rats with extremes in trait anxiety – involvement of the dopamine system in the nucleus accumbens. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(12):1969-1980. DOI 10.1016/j.psyneuen.2012.04.011
- Berman S., Ozkaragoz T., Young R. McD., Noble E. D2 dopamine receptor gene polymorphism discriminates two kinds of novelty seeking. *Pers. Individ. Differ.* 2002;33(6):867-882. DOI 10.1016/S0191-8869(01)00197-0
- Blum K., Oskar-Bermann M. Genetic addiction risk score (GARS): molecular neurogenetic evidence for predisposition to reward deficiency syndrome (RDS). *Mol. Neurobiol.* 2014;50:765-796. DOI 10.1007/s12035-014-8726-5
- Colombo G., Agabio R., Lobina C., Reali R., Zocchi A., Fadda F., Gessa G.L. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. *Physiol. Behav.* 1995;57:1181-1185. DOI 10.1016/0031-9384(94)00382-F

- Comings D.E., Blum K. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog. Brain Res.* 2000;126:325-341. DOI 10.1016/S0079-6123(00)26022-6
- Conger J.J. Alcoholism: theory, problem and challenge. *Quart J. Stud. Alcohol.* 1956;17(2):296-305.
- De Wit H., Söderpalm A.H.V., Nikolayev L., Young L. Effects of acute social stress on alcohol consumption in healthy subjects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2003;27:1270-1277. DOI 10.1097/01.ALC.0000081617.37539.D6
- Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Y., Kozhemyakina R.V., Herbeck Y.E., Prasolova L.A., Oskina I.N., Plyusnina I.Z. The influence of social environment in early life on the behavior, stress response, and reproductive system of adult male Norway rats selected for different attitudes to humans. *Physiol. Behav.* 2015;15(144):116-123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.018>
- Henniger M.S., Spanagel R., Wigger A., Landgraf R., Höltner S.M. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2002;26(6):729-736.
- Hoenicka J., Quiñones-Lombrana A., España-Serrano L., Alvira-Botero X., Kremer L., Pérez-González R., Rodríguez-Jiménez R., Jiménez-Arriero M., Ponce G., Palomo T. The *ANKK1* gene associated with addictions is expressed in astroglial cells and upregulated by apomorphine. *Biol. Psychiat.* 2010;67(1):3-11. DOI 10.1016/j.biopsych.2009.08.012
- Kudryavtseva N., Gerrits M.A., Avgustinovich D.F., Tenditnik M.V., Van Ree J.M. Anxiety and ethanol consumption in victorious and defeated mice; effect of kappa-opioid receptor activation. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2006;16(7):504-511. DOI 10.1016/j.euroneuro.2006.01.002
- Lu R.B., Lee J.F., Huang S.Y., Lee S.Y., Chang Y.H., Kuo P.H., Chen S.L., Chen S.H., Chu C.H., Lin W.W., Wu P.L., Ko H.C. Interaction between *ALDH2*1*1* and *DRD2/ANKK1* TaqI A1A1 genes may be associated with antisocial personality disorder not co-morbid with alcoholism. *Addict. Biol.* 2012;17(5):865-874. DOI 10.1111/j.1369-1600.2010.00268.x
- Meisch R.A., Lemaire G.A. Drug Self-administration. Ed. F. van Harren. *Methods in Behavioral Pharmacology.* Amsterdam: Elsevier, 1993;257-300.
- Möller C., Wiklund L., Thorsell A., Hyytiä P., Heilig M. Decreased measures of experimental anxiety in rats bred for high alcohol preference. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1997;21:656-660. DOI 10.1111/j.1530-0277.1997.tb03818.x
- 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.
- Neville M.J., Johnstone E.C., Walton R.T. Identification and characterization of *ANKK1*: a novel kinase gene closely linked to *DRD2* on chromosome band 11q23.1. *Hum. Mutat.* 2004;23:540-545. DOI 10.1002/humu.20039
- Nikulina E.M., Avgustinovich D.F., Popova N.K. Neural control of predatory aggression in wild and domesticated animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1992;18(1):65-72.
- Oskina I.N., Herbeck Yu.E., Shikhevich S.G., Plyusnina I.Z., Gulevich R.G. Alterations in the hypothalamus-pituitary-adrenal and immune systems during selection of animals for tame behavior. *Informatsionny Vestnik VOGiS=The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists.* 2008;12(1/2):39-49.
- Plyusnina I., Oskina I. 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., Solov'eva M.Y., Oskina I.N. Effect of domestication on aggression in gray Norway rats. *Behav. Genet.* 2011;41(4):583-592. DOI 10.1007/s10519-010-9429-y
- Plyusnina I.Z., Trut L.N., Karpushkeeva N.I., Alekhina T.A., Oskina I.N. Some behavioral and physiological features of the nonagouti mutation in Norway rats selected for aggressive behavior. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 2003;53(6):730-738.
- Rodgers R.J., Cole J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. *Ethology and Psychopharmacology.* Eds S.J. Cooper, C.A. Hendrie. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1994;9-44.
- Spanagel R., Noori H.R., Heilig M. Stress and alcohol interactions: animal studies and clinical significance. *Trends Neurosci.* 2014;37(4):219-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.006>
- Stewart R.B., Gatto G.J., Lumeng L., Li T.-K., Murphy J.M. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol.* 1993;10:1-10. DOI 10.1016/0741-8329(93)90046-Q
- Thomas S.E., Bacon A.K., Randall P.K., Brady K.T., See R.E. An acute psychosocial stressor increases drinking in non-treatment-seeking alcoholics. *Psychopharmacology.* 2011;218:19-28. DOI 10.1007/s00213-010-2163-6
- Veenema A.H., Neumann I.D. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. *Brain Behav. Evol.* 2007;70:274-285. DOI 10.1159/000105491

Влияние космического полета на экспрессию генов в головном мозге экспериментальных животных

А.С. Цыбко, Т.В. Ильчибаева, Н.К. Попова

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

Космический полет вызывает ряд серьезных побочных физиологических изменений в первую очередь из-за состояния микрогравитации. В поисках механизмов, лежащих в основе этих изменений, были разработаны многие подходы: от моделирования микрогравитации на Земле до исследований в космосе, неотъемлемой частью которых является исследование экспрессии генов и белков. В отличие от костной и мышечной тканей, молекулярные изменения, происходящие в нервных клетках во время космических полетов, практически не исследованы. Целью данного обзора является обобщение последних достижений в области исследования экспрессии генов и белков в нервной системе в условиях микрогравитации. В значительной степени обзор будет посвящен результатам полета биоспутника «Бион-М1». Впервые нами были выявлены чувствительные к микрогравитации гены дофаминовой (ДА) и серотониновой (5-HT) систем: тирозин гидроксилаза (TH), катехол-о-метилтрансфераза (COMT) и дофаминовый рецептор первого типа (D1) в нигростриатальной системе; серотониновые рецепторы 2A подтипа (5-HT_{2A}) и D1 рецепторы в гипоталамусе и моноаминоксидаза А (MAO А) во фронтальной коре. Снижение экспрессии ключевых генов дофаминовой системы может вносить вклад в развитие двигательных нарушений и дискинезии во время космического полета как у животных, так и человека. Также под действием микрогравитации активируется и система нейронального апоптоза, о чем свидетельствуют повышение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-XL в гиппокампе и ее снижение в гипоталамусе. Длительный космический полет привел к дисрегуляции экспрессии генов, кодирующих глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и дофаминовый нейротрофический фактор (CDNF) мозга. Данные нейротрофические факторы играют важнейшую роль в поддержании и защите дофаминергических нейронов, поэтому снижение их экспрессии в нигростриатальной дофаминовой системе может быть одной из причин негативного воздействия космического полета на дофаминовую систему мозга. Уникальность данных, полученных в результате полета биоспутника «Бион-М1», заключается в том, что они впервые позволили подвести молекулярно-генетическую основу под известные на сегодня нейрофизиологические механизмы адаптации центральной нервной системы к состоянию микрогравитации.

Ключевые слова: космический полет; микрогравитация; нервная система; «Бион-М1»; экспрессия генов.

The effect of space flight on gene expression in brain

A.S. Tsybko, T.V. Ilchibaeva, N.K. Popova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Many serious adverse physiological changes occur during spaceflight, primarily due to microgravity. In search of underlying mechanisms, many experimental tools have been developed, ranging from microgravity modeling on Earth to spaceflight investigations, part of which is to study the expression of genes and proteins. Unlike bone and muscle tissue, molecular changes in nerve cells during spaceflight are practically unexplored. This review aims at summarizing the recent advances in identifying gene and protein expression changes of nervous system cells under microgravity conditions. To a large extent, this review will focus on the results of the Bion-M1 biosatellite. We have for the first time revealed dopamine and serotonin microgravity-responsive genes (tyrosine hydroxylase, catechol-O-methyltransferase, and D1 receptor in the nigrostriatal system; D1 and 5-HT_{2A} receptors in the hypothalamus; and monoamine oxidase A in the frontal cortex). Decreased genetic control of the dopamine system may contribute to the spaceflight-induced locomotor impairment and dyskinesia described for both animals and humans. Also, the system of neuronal apoptosis is activated under the influence of microgravity as evidenced by changes in the expression of anti-apoptotic protein Bcl-XL in the hippocampus and hypothalamus. The long spaceflight produced dysregulation in the genetic control of genes encoding GDNF and CDNF neurotrophic factors. Because they play a crucial role in the protection and maintenance of dopaminergic neurons, reducing their expression may be one of the reasons for the negative impact of spaceflight on the brain dopamine system. Thus, the data obtained from the flight of the Bion-M1 biosatellite for the first time allowed for creating a molecular genetic basis for the currently known neurophysiological mechanisms of adaptation of the central nervous system to the state of weightlessness.

Key words: space flight; microgravity; nervous system; Bion-M1; gene expression.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Цыбко А.С., Ильчибаева Т.В., Попова Н.К. Влияние космического полета на экспрессию генов в головном мозге экспериментальных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):172-179. DOI 10.18699/VJ16.134

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Tsybko A.S., Ilchibaeva T.V., Popova N.K. The effect of space flight on gene expression in brain. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):172-179. DOI 10.18699/VJ16.134

REVIEW

Received 15.09.2015 г.

Accepted for publication 03.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

e-mail: antoncybko@mail.ru

В течение космического полета у космонавтов наблюдается множество серьезных побочных физиологических изменений, в число которых входят перераспределение жидкостей, усиление почечной фильтрации, ухудшение функционирования иммунной системы и физического состояния сердечно-сосудистой системы, изменение поступающей сенсорной информации, истощение костной ткани, потеря мышечной массы (Clément, Reschke, 2008; Blaber et al., 2010; Clément, Ngo-Anh, 2013; De la Torre, 2014). Многим из этих патофизиологических адаптаций невозможно противостоять в достаточной мере при помощи физических упражнений или пищевых добавок, что предполагает наличие дополнительных молекулярных механизмов, ответственных за эти изменения. Для разработки высокоэффективных контрмер и предотвращения специфических «космических» заболеваний крайне важно понять механизмы, посредством которых состояние микрогравитации вызывает столько нарушений.

До сих пор наиболее заметные молекулярные эффекты микрогравитации были исследованы в клетках костной (Hughes-Fulford, 2002; Klein-Nulend et al., 2003; Оганов, Богомолов, 2009), мышечной (Оганов, Потапов, 2006; Atomi, 2015) и иммунной (Felix et al., 2004; Degan et al., 2005; Nichols et al., 2006) систем. Животные и клеточные модели были изучены *in vivo* или *in vitro* во время космических полетов и в условиях симулированной микрогравитации (в тесте подвешивания за хвост или специальных биореакторах). Были идентифицированы многие метаболические и сигнальные пути, подверженные воздействию микрогравитации. Через эти пути микрогравитация влияет на различные клеточные функции, такие как пролиферация, дифференцировка, созревание и выживание. Однако стоит отметить, что по сравнению с костной и мышечной тканями молекулярные адаптации нервных клеток практически не исследованы. В течение полета и после него наблюдаются различные неврологические изменения, наиболее выраженными из которых являются: космическое двигательное расстройство (Space Motion Sickness, SMS), космический адаптационный синдром (Space Adaptation Syndrome, SAS), иллюзия положения тела, зрительные нарушения, нейромышечная усталость, слабость, нарушение равновесия и атаксия после возвращения на Землю (Fujii, Patten, 1992). Процесс адаптации центральной нервной системы (ЦНС) к состоянию микрогравитации (как и любой процесс адаптации ЦНС) сопровождается нейропластическими изменениями, которые являются краеугольным камнем функционирования мозга (Slenzka, 2003; De la Torre, 2014). Нейроморфологические исследования указывают на структурные изменения в различных областях мозга как взрослых, так и молодых животных, побывавших в невесомости (Krasnov, 1994; DeFelipe et al., 2002). Неполнота имеющихся данных оставляет открытым вопрос о том, как воздействие микрогравитации сказывается на процессах нейропластичности на молекулярном уровне. Исследования последних лет все больше концентрируются на экспрессии генов в клетках, культивируемых в условиях микрогравитации, однако большую важность имеют и данные, полученные *in vivo*. Важной вехой в космических исследованиях на живых

Принятые сокращения

5-НТ – серотонин;
 ТПГ2 – триптофан гидроксилаза 2;
 5-НТТ – транспортер серотонина;
 рецептор 5-НТ_{1A} – рецептор серотонина подтипа 1A;
 рецептор 5-НТ_{2A} – рецептор серотонина подтипа 2A;
 рецептор 5-НТ₃ – рецептор серотонина подтипа 3;
 MAO A – моноаминоксидаза;
 MAO B – моноаминоксидаза B;
 ДА – дофамин;
 TH – тирозингидроксилаза;
 DAT – транспортер дофамина;
 COMT – катехол-О-метилтрансфераза;
 рецептор D1 – рецептор дофамина 1-го подтипа;
 рецептор D2 – рецептор дофамина 2-го подтипа;
 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор мозга;
 GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) – глиальный нейротрофический фактор;
 CDFN (cerebral dopamine neurotrophic factor) – дофаминовый нейротрофический фактор мозга;
 NGF (nerve growth factor) – фактор роста нервов;
 CNTF (ciliary neurotrophic factor) – цилиарный нейротрофический фактор;
 BAX (Bcl-2-associated X protein) – Bcl-2-ассоциированный белок X;
 Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) – очень крупный белок B-клеточной лимфомы;
 TrkB (tropomyosin receptor kinase B) – тропомиозина рецепторная киназа B;
 p75 (low-affin y nerve growth factor receptor) – низкоаффинный рецептор фактора роста нервов;
 ОТ – обратная транскрипция;
 ПЦР – полимеразная цепная реакция.

организмах стал недавний полет биоспутника «Бион-М1», в задачи которого входила в том числе и оценка эффектов длительного пребывания в условиях микрогравитации на экспрессию различных нейрогенов в головном мозге. Цель обзора – обобщить последние достижения в области исследования экспрессии генов и белков в нервной системе в условиях микрогравитации. Особое внимание в обзоре уделено результатам проекта «Бион-М1».

Эффекты микрогравитации на экспрессию генов в нервной системе

Как и в случае с другими системами организма, адаптация нервной системы к состоянию невесомости изучается не только в ходе космических миссий на орбитальной станции и биоспутниках, но также и в наземных экспериментах, призванных смоделировать (хотя бы отчасти) состояние микрогравитации. Внутриклеточные эффекты исследуются в специальных системах ротационных клеточных культур (Rotary Cell Culture System, RCCS), содержащих сосуды с вращающимися стенками (Rotating-Wall Vessel, RWV), работа которых основана на процессе трехмерного клиностагирования (Blaber et al., 2010). Особенность RWV состоит в том, что в процессе

вращения гравитационные векторы рандомизированы. Таким образом, из-за динамического равновесия, существующего между гравитационной (F_g) и центробежной (F_c) силами и сопротивлением среды (F_d), клеточная масса постоянно остается в состоянии свободного падения, что и дает симуляцию микрогравитации (Unsworth, Lelkes, 1998; Freed et al., 1999). Для моделирования микрогравитации на целых организмах используются два типа тестов: у крыс и мышей – подвешивание за хвост с высвобождением задних конечностей (hind-limb unloading, HU), у человека – постельный режим в положении вниз головой (head-down bed rest) (Aubert et al., 2005; Delp, 2008). Как следует из названий обоих тестов, в первом случае животное (обычно крыса или мышь) подвешивают за хвост или задние конечности, и таким образом достигается состояние гравитационной разгрузки для задней части тела и перераспределение жидкости в организме (Morey-Holton, Globus, 1998; Basso et al., 2005), а во втором случае голова пациента расположена на шесть градусов ниже тела, что позволяет смоделировать приток жидкости к ней (Baisch et al., 2002; Trappe et al., 2006). Разумеется, оба теста имеют ограничения, так как на Земле и в околоземном пространстве на ткани тела действуют разные гравитационные силы: в то время как на поверхности Земли гравитация сжимает тело, на орбите под воздействием реальной микрогравитации давление вокруг тела является отрицательным (Convertino et al., 1997; Regnard et al., 2001).

Использование трехмерного клиноостатирования показало, что глиальные клетки, пребывающие в такой среде в течение всего 30 мин, получают повреждения цитоскелета, выраженные в дезорганизации микрофиламентов (F-актин), промежуточных филаментов (виментин, GFAP) и микротрубочек (альфа-тубулин) (Uva et al., 2002b). Эти данные хорошо согласуются с показанным ранее снижением уровня мРНК GFAP в гиппокампальных астроцитах крыс, побывавших в реальном космическом полете (Day et al., 1998), а также с выявленной позднее дисрегуляцией тубулина и миозина в гиппокампальных нейронах крыс, подвергнутых искусственной микрогравитации в HU модели (Sarkar et al., 2006). Отметим, что через 20 ч нахождения в условиях искусственной микрогравитации изменения в клетках были менее выраженными, и это, вероятно, связано с завершившейся реорганизацией цитоскелета (Uva et al., 2002b). Также было показано, что через 30 мин вращения культуры клеток глиомы C6 в клиностате происходит конденсация хроматина, а в цитоплазме появляется каспаза-7, что свидетельствует о клеточном апоптозе в состоянии искусственной микрогравитации (Uva et al., 2002a). Однако через 32 ч вращения апоптотические процессы выражены относительно слабо. В то же время в культуре астроцитов наблюдаются не только схожие молекулярные изменения, но и гибель значительной части клеток (Uva et al., 2002c). Помимо апоптоза, в состоянии искусственной микрогравитации наблюдаются усиление оксидативного стресса и ускоренное старение клеток (Wang et al., 2009). Моделирование микрогравитации с помощью HU в течение 7 дней также показывает увеличение числа активных форм кислорода в стволе мозга и фронтальной

коре мышей (Wise et al., 2005). В гипоталамусе мышей, подвергнутых HU, наблюдается уменьшение количества супероксиддисмутазы-2 и увеличение малатдегидрогеназы и пероксиредоксина-6, что отражает ослабление антиоксидантной системы и оксидативный дисбаланс в данной структуре мозга (Sarkar et al., 2008). Вместе с этим во всех структурах мозга происходят активация транскрипционного фактора NF- κ B и фосфорилирование митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) (Wise et al., 2005). Моделирование микрогравитации подвешиванием мышей за хвост выявило в гиппокампе существенное уменьшение количества β -синуклеина, который, действуя как молекулярный шаперон, препятствует ненормальной агрегации белков. Вероятно, поэтому в условиях микрогравитации может наблюдаться ненормальная белковая агрегация, приводящая к более сложному ответу в нервных клетках (Sarkar et al., 2006).

Культивирование клеток в RWV биореакторе, по видимому, создает специфичные условия для ускоренной дифференцировки PC-12 клеток в нейрэндокринные, что выражается в формировании специфических органоидов и усилении экспрессии фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы и белка быстрого реагирования c-fos (Lelkes et al., 1998). Chen с коллегами (2011) сообщают, что культивирование мезенхимальных клеток в состоянии искусственной микрогравитации усиливает их дифференцирование в нейроны. В полученных таким образом нейрональных клетках высоко экспрессированы ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP-2), тирозингидроксилаза, холин ацетилтрансфераза, а также нейротрофические факторы NGF, BDNF и CNTF (Chen et al., 2011). Отметим, что следов апоптоза в культивированных клетках вышеуказанные исследователи не обнаружили и даже предложили свой метод дифференцировки в качестве хорошего источника получения нейронов для регенеративной медицины. В то же время Константинова с коллегами (2010) в своей работе показали, что с увеличением времени клиноостатирования снижается темп дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в нейрональные. Это было видно по уменьшению количества MAP2 (маркера поздней дифференцировки), в то время как уровень β -III тубулина (маркера ранней дифференцировки) оставался достаточно высоким в группе клеток, подвергнутых клиноостатированию (Константинова и др., 2010). Исходя из этого можно сделать вывод, что длительное нахождение эмбриональных стволовых клеток в неприкрепленном положении в состоянии искусственной микрогравитации, оказывающее на них неспецифические механические воздействия, задерживает процессы дифференцировки. В эксперименте «Строма-2» (в рамках миссии ISS 12S, 30.03–08.04 2006 г.) при культивировании мезенхимальных стволовых клеток в условиях реальной микрогравитации было отмечено угнетение пролиферативной активности клеток, а применение ДНК-микрочипов показало снижение экспрессии большого числа генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла (Monticone et al., 2010). Но вместе с этим применение ДНК-микрочипов выявило активацию большого числа генов-маркеров нейрональной дифференцировки, а также генов, отвечающих за синаптогенез и передачу нервного импульса.

Таким образом, на основе данных, полученных в условиях реальной (Monticone et al., 2010) и искусственной (Chen et al., 2011) микрогравитации, можно заключить, что это специфическое состояние определенным образом усиливает процесс нейрональной дифференцировки при общем ослаблении пролиферативной и дифференциальной активности клеток.

Современные исследования, направленные на изучение экспрессии генов в мозге животных, побывавших в состоянии настоящей микрогравитации, единичны. В работе Santucci с коллегами (2012) исследовано воздействие 91-дневного космического полета на экспрессию самых разнообразных генов и белков в мозге мышей C57BL/10J дикого типа и трансгенных животных со сверхэкспрессией плеотрофина (гепарин-связанного митогена мозга). Выявлены тенденция к снижению экспрессии NGF в гиппокампе и коре мышей дикого типа из «полетной» группы, а также подавление экспрессии ряда генов, имеющих отношение к метаболическим и каталитическим процессам и оксидоредуктазной активности. Также выявлено, что в ходе космического полета экспрессия 28 белков была повышена. Эти белки участвуют в метаболических процессах, протекающих в митохондриях, синтезе и гидролизе АТФ, метаболизме кальция/кальмодулина и транспорте белков и/или аминокислот (Santucci et al., 2012). К сожалению, все данные получены на крайне ограниченной выборке животных. В ходе полета в живых остались только одна мышь дикого типа и два трансгенных животных, что делает практически невозможными правильные интерпретацию и экстраполяцию полученных результатов.

Как уже отмечено выше, подвешивание животных за хвост является распространенной моделью микрогравитации, доказавшей свою релевантность в отношении костной, мышечной, кровеносной и прочих систем организма. Однако попытка по возможности более целостно рассмотреть экспрессию различных генов в мозге НУ животных была предпринята только в работе Frigeri с коллегами (2008). При помощи ДНК микрочипов им удалось оценить уровень экспрессии примерно 4800 генов в мозге животных, подвешенных за хвост в течение 2 нед. Из 4749 генов значительно изменилась экспрессия у 592. Из них у 258 генов (43,5 %) экспрессия снизилась, а у 334 (56,5 %) – повысилась. Среди генов, экспрессия которых повысилась, выделяется *Grin1*, кодирующий первую (и наиболее важную) субъединицу NMDA-рецептора (ионотропного рецептора глутамата). Поскольку NMDA-рецепторы вовлечены в процессы памяти, авторы исследования считают, что их сенситизация может усилить способность к обучению. Среди генов с пониженной экспрессией интересен *Itga3*, кодирующий альфа3 субъединицу трансмембранного гетеродимерного (α , β) комплекса. Являясь представителями семейства интегринов, молекул клеточной адгезии, они действуют и как усилители передачи возбуждающего сигнала в гиппокампальных синапсах, модулируя активность обоих AMPA-типов MDAR глутаматных рецепторов (Kramar et al., 2003). Также отмечено усиление экспрессии генов *vdac1* и *vdac3*, кодирующих потенциал-зависимые анионные каналы (VDAC), которые локализованы на внешней мембране митохондрий и при-

нимают участие в процессе апоптоза (Elinder et al., 2005). Кроме того, выявлено изменение экспрессии генов *Scnn1b*, *Cacnb3*, *Kcnc4*, *Kcnc2*, кодирующих субъединицы натриевого, кальциевого и калиевого каналов соответственно. Авторы статьи, однако, не исключают, что выявленные ими изменения являются не эффектами искусственной микрогравитации, а следствием отсутствия движений или стресса, влияющих на функционирование ЦНС (Frigeri et al., 2008).

Эффект космического полета на экспрессию нейрогенов в мозге мышей

С 19 апреля по 19 мая 2013 г. состоялся полет биоспутника «Бион-М1». Впервые в практике отечественной биологии и физиологии для длительного полетного эксперимента были выбраны самцы мышей линии C57Bl/6N, что позволило сделать акцент на молекулярно-биологических исследованиях. Важной частью проекта было исследование реакции нервной системы на длительное пребывание в условиях микрогравитации. С подробным описанием схемы эксперимента можно ознакомиться в работах: Сычев с коллегами (2014), Андреев-Андриевский с коллегами (2014), Andreev-Andrievskiy с коллегами (2015). Полетная группа мышей (всего 45 особей) пребывала в состоянии микрогравитации в течение 30 сут, в то время как на Земле в виварии для контроля содержали интактных животных. По возвращении мышей на Землю у 6 особей были извлечены фронтальная и зрительная кора, гиппокамп, гипоталамус, стриатум, черная субстанция и область ядер шва среднего мозга для дальнейшего исследования экспрессии нейрогенов в лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН. Экспрессия генов исследована нами с помощью метода количественного ОТ-ПЦР в реальном времени. Для того чтобы отделить эффект микрогравитации от эффекта стресса на экспрессию исследуемых генов, была проведена специальная серия экспериментов на семи мышах, которых содержали в течение одного месяца в таких же капсулах, как и использованных в космическом полете, но в условиях гравитации (наземный кабинный контроль). Группа интактных мышей была использована в качестве дополнительного контроля для мышей кабинной контрольной группы (Andreev-Andrievskiy et al., 2015).

Серотониновая система ответила на длительный космический полет снижением экспрессии генов, кодирующих 5-HT_{2A} рецептор в гипоталамусе и фермент катаболизма серотонина MAO A во фронтальной коре (Popova et al., 2014). Однако можно признать, что космический полет оказал ограниченный эффект на генетический контроль 5-НТ системы. Не выявлены изменения в экспрессии генов, кодирующих основные регуляторы функциональной активности 5-НТ системы: ТПГ-2, 5-НТТ и 5-НТ_{1A} рецепторы. ТПГ-2 является ключевым и единственным специфическим ферментом биосинтеза 5-НТ в мозге, а 5-НТ_{1A} рецептор занимает центральное место в ауторегуляции 5-НТ системы (Popova, Naumenko, 2013). Космический полет также не привел к каким-либо существенным изменениям экспрессии 5-НТ₃ рецепторов.

MAO A катализирует оксидативное дезаминирование 5-НТ (и частично ДА) и является основным ферментом его деградации. Исследование экспрессии гена MAO A

у мышей наземного кабинного контроля позволило выявить, что снижение экспрессии MAO A во фронтальной коре является эффектом микрогравитации, а не условий содержания. Вероятно, ослабление процессов катаболизма 5-НТ во фронтальной коре могло привести к накоплению нейромедиатора в данной проекционной области с потенциальными эффектами на поведение животных.

До этого момента все исследования 5-НТ системы в условиях микрогравитации были ограничены гипоталамической областью. Уровень 5-НТ и активность фермента моноаминоксидазы были определены в гипоталамусе крыс после 19,5 сут космического полета на борту биоспутников «Космос 782» и «Космос 936» (Kvetnansky et al., 1983). Никаких существенных изменений в уровне серотонина или активности моноаминоксидазы выявлено не было. В космическом эксперименте биоспутника «Космос 1129» была исследована концентрация 5-НТ в изолированных ядрах из гипоталамуса крысы после 18,5 сут космического полета. В большинстве гипоталамических ядер концентрация 5-НТ была неизменной, но в супраоптических ядрах было выявлено повышение, а в паравентрикулярных – снижение концентрации (Culman et al., 1985). Было высказано предположение, что длительный космический полет и микрогравитация не являются стрессогенными факторами по отношению к 5-НТ системе в гипоталамусе. Однако новые данные заставляют пересмотреть эту точку зрения.

Нами выявлено снижение экспрессии 5-НТ_{2A} рецепторов в гипоталамусе (Ророва et al., 2014). Функциональное значение этого эффекта космического полета не вполне ясно, но, принимая во внимание участие 5-НТ_{2A} рецепторов в регуляции большого числа физиологических функций, включая сон, мышление и память, любое изменение в генетической регуляции данных рецепторов может иметь существенные последствия. Известно, что 5-НТ_{2A} рецепторы способны модулировать секрецию окситоцина и кортиколиберина, так как расположены на телах клеток, синтезирующих эти гормоны, в паравентрикулярном ядре гипоталамуса (Van de Kar et al., 2001). Активация 5-НТ_{2A} рецепторов усиливает секрецию всех гормонов, классифицируемых как «стрессовые» (Zhang et al., 2002; Demjanoska et al., 2004). А так как паравентрикулярное ядро гипоталамуса играет ключевую роль в адаптивном ответе на стрессорные факторы, снижение экспрессии 5-НТ_{2A} рецепторов можно рассматривать как дезадаптивную реакцию, понижающую эффективность стрессового ответа. Подтверждением этого служат выраженные морфологические и функциональные изменения гипоталамических ядер после космического полета (Krasnov, 1994). Участие 5-НТ_{2A} рецепторов в нейроэндокринном ответе на стресс предполагает, что снижение экспрессии данных рецепторов в условиях микрогравитации создает уязвимость гипоталамуса, что также согласуется с концепцией развития гипонорадренергического синдрома в условиях микрогравитации (Krasnov, 1991).

Говоря о гипоталамусе, нельзя не упомянуть выявленное у мышей полетной группы понижение уровня мРНК гена, кодирующего антиапоптотический белок Bcl-XL (один из основных членов Bcl-2 семейства). Одновременно с этим повышение уровня мРНК Bcl-XL было

обнаружено в гиппокампе (Naumenko et al., 2015). В нем была повышена и экспрессия мРНК гена, кодирующего основной проапоптотический белок BAX, но в то же время в группе кабинного контроля наблюдалось незначительное (но статистически значимое) снижение экспрессии мРНК данного гена (Naumenko et al., 2015). Вероятно, экспрессия BAX более подвержена воздействию средового стресса, чем эффектам, вызванным непосредственно состоянием микрогравитации. Литературные данные о влиянии микрогравитации на систему апоптотических белков противоречивы. Во всех работах по этой тематике исследовано воздействие искусственной микрогравитации, не рассматривались нейрональные клетки, а вместо Bcl-XL исследован белок Bcl-2. В одной работе никаких эффектов микрогравитации на систему BAX/Bcl-2 выявлено не было (Rucci et al., 2002). В другом исследовании показано повышение уровня BAX и снижение уровня Bcl-2 в клетках карциномы (Kossmehl et al., 2003). В работе Nakamura с коллегами (2003) искусственная микрогравитация вызвала повышение соотношения BAX/Bcl-2 в остеобластах человека. Также показано, что воздействие искусственной микрогравитации повышает уровень как BAX, так и Bcl-2 в эндотелиальных клетках человека (Infanger et al., 2007). Но в то же время показано, что в пульмонарных микроваскулярных эндотелиальных клетках микрогравитация, напротив, повышает экспрессию BAX и снижает экспрессию Bcl-2 (Kang et al., 2011). В целом можно заключить, что микрогравитация (даже искусственная) активирует белки системы апоптоза. Ранее мы уже отметили некоторые свидетельства в пользу усиления апоптоза в культуре нейрональных клеток, поэтому предполагаем, что усиление экспрессии Bcl-XL, вероятно, является компенсаторным, направленным на ослабление апоптоза, который может иметь место в гиппокампе и гипоталамусе.

Интересные изменения были выявлены в экспрессии генов DA системы (Ророва et al., 2014). Эта система, помимо известной роли фактора внутреннего подкрепления, занимает одно из важнейших мест в регуляции моторной функции, тонуса мышц, осуществлении статокINETической функции, координации мелких и точечных движений (Grace, 2002). За двигательный контроль отвечает nigrostriальная DA система, состоящая из черной субстанции (в которой расположены тела DA нейронов) и стриатума, где находятся DA терминали (Grace, 2002). Нами было обнаружено, что космический полет приводит к существенному снижению в черной субстанции экспрессии TH – основного фермента синтеза дофамина. Вместе с этим снижается и экспрессия в стриатуме одного из основных ферментов катаболизма дофамина – COMT. Также отмечено снижение в стриатуме и гипоталамусе экспрессии дофаминового D1 рецептора. Один из основных эффектов микрогравитации связан с механическими и проприоцептивными изменениями в процессе выполнения действий, приводящими к разрушению привычных взаимодействий между эфферентными и афферентными сигналами (Clément, Reschke, 2008). Другими словами, первичный двигательный дефицит в результате снижения уровня афферентных сигналов к соматосенсорной системе и двигательным путям является функцией адаптации, связанной с длительным пребыванием в условиях микрогра-

витаии (Clément, Reschke, 2008; Clément, Ngo-Anh, 2013). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о снижении генетического контроля нигростриальной дофаминовой системы, вероятно, вызванном уменьшением афферентного входа при состоянии микрогравитации.

Были исследованы эффекты длительного космического полета на экспрессию нейротрофических факторов GDNF и CDNF. Нами выявлено, что у мышей полетной группы снижен уровень мРНК гена GDNF в стриатуме и гипоталамусе, но в то же время существенно повышен во фронтальной коре и области ядер шва среднего мозга (Tsybko et al., 2015). Экспрессия мРНК гена CDNF также изменилась: существенно снизилась в черной субстанции и повысилась в ядрах шва (Tsybko et al., 2015). Оба указанных нейротрофических фактора играют важную роль в функционировании ДА системы мозга. GDNF синтезируется в стриатальных нейронах и необходим для роста, защиты и поддержания нигростриальных ДА нейронов (Andressoo, Saarma, 2008; Saavedra et al., 2008). GDNF необходим для зрелых ДА нейронов, поскольку подавление активности этого трофического фактора приводит к их массовой гибели (Pascual et al., 2008). Нейротрофический фактор CDNF был открыт сравнительно недавно (Lindholm et al., 2007), но уже доказана его важная роль в созревании, росте и защите ДА нейронов (Lindholm, Saarma, 2010; Airavaara et al., 2012; Cordero-Llana et al., 2015). У мышей полетной группы снижение экспрессии GDNF и CDNF в нигростриальной системе хорошо согласуется с данными о снижении экспрессии генов ДА системы. В свою очередь, ДА является одним из регуляторов GDNF и, вероятно, CDNF (Saavedra et al., 2008; Lindholm, Saarma, 2010), поэтому снижение функции ДА системы может быть причиной снижения экспрессии GDNF и CDNF. Также свой вклад вносит снижение афферентной активности ДА нейронов в условиях недостаточной активации черной субстанции. Афферентная активность регулирует экспрессию нейротрофических факторов (Hughes et al., 1999). Существует ряд свидетельств того, что отсутствие афферентной активности в разрушенных ДА нейронах подавляет экспрессию GDNF (Saavedra et al., 2008). Хорошо известно, что дефицит GDNF провоцирует у животных состояние, сходное с болезнью Паркинсона (Pascual et al., 2011). Поэтому тот факт, что в ходе космического полета снижается экспрессия не только основных генов ДА системы, но и генов нейротрофических факторов, участвующих в ее поддержании, может иметь весьма серьезные последствия при длительном пребывании в состоянии микрогравитации. Наблюдавшееся нами повышение экспрессии GDNF и CDNF во фронтальной коре и области ядер шва можно рассматривать как компенсаторное, направленные на облегчение негативных эффектов нахождения в состоянии микрогравитации.

Иначе обстоит дело с другим известным нейротрофическим фактором, BDNF. Длительное пребывание в условиях реальной микрогравитации не оказало эффекта на экспрессию BDNF и его рецепторов TrkB и p75 (Naumenko et al., 2015), что совпадает с данными Santucci с коллегами (2012). Тот факт, что во время космического полета экспрессия BDNF не подавляется и не активизируется, может

быть как-то связан с нарушением синаптогенеза и морфологии синапсов, выявленным у животных, побывавших в космическом полете (Krasnov, 1994; DeFelipe et al., 2002).

Результаты, полученные в рамках проекта «Бион-М1», в очередной раз показали важность проведения исследований на животных для понимания влияния условий микрогравитации на организм человека. Однако сложность выполнения программ экспериментальных исследований на животных в космическом полете ограничивает частоту их проведения. Данные, полученные при моделировании микрогравитации в наземных исследованиях, будь то RWV биореактор или HU модель, зачастую расходятся с теми результатами, которые получают при исследовании животных в космическом полете. Так, целенаправленное сравнение подвешенных за хвост крыс с крысами, побывавшими в космическом полете в проекте «Космос 2044», выявило схожесть эффектов в мышечной, скелетной, кардиоваскулярной и иммунной системах, однако специфические изменения в мотонейронах наблюдались только у крыс полетной группы (Morey-Holton et al., 2005). К сожалению, сравнение эффектов в ЦНС в проекте «Космос 2044» не проводили, но сейчас мы имеем возможность сравнить данные проекта «Бион-М1» с исследованием Frigeri с коллегами (2008). Обращает на себя внимание то, что изменение экспрессии нейрогенов 5-НТ и ДА систем, системы апоптоза и нейротрофических факторов наблюдается только у мышей, побывавших в условиях реальной, но не искусственной микрогравитации. Стоит признать, что релевантность HU модели в отношении центральной нервной системы недостаточна, поскольку данная модель не только не учитывает, но и в принципе не способна воспроизвести особые адаптивные изменения в головном мозге, происходящие в состоянии микрогравитации. Сенсомоторная адаптация к отсутствию такой фундаментальной силы, как гравитация, должна включать мультимодальную реорганизацию, перегруппировку или перекалибровку нейронов и нейронных сетей (Clément, Ngo-Anh, 2013). Ответ на вопрос, как мозг адаптируется к состоянию микрогравитации, находится в ведении интегративной физиологии, но ответить на него невозможно без данных генетики, биохимии и молекулярной биологии, полученных на животных, находившихся в реальном космическом полете. Равно как и понимание некоторых молекулярных изменений в мозге при микрогравитации невозможно без применения базовых нейрофизиологических принципов.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-00173, and State Project 0324-2015-0004.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Airavaara M., Harvey B.K., Voutilainen M.H., Shen H., Chou J., Lindholm P., Lindahl M., Tuominen R.K., Saarma M., Hoffer B., Wang Y. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. *Cell Transplant.* 2012;21:1213-1223.

- Andreev-Andrievskiy A., Popova A., Boyle R., Alberts J., Shenkman B., Vinogradova O., Dolgov O., Anokhin K., Tsvirkun D., Soldatov P., Nemirovskaya T., Ilyin E., Sychev V. Mice in Bion-M 1 space mission: training and selection. *PLoS One*. 2015;9. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0104830/> (Accessed 18 August 2014).
- Andreev-Andrievskiy A.A., Shenkman B.S., Popova A.S., Dolgov O.N., Anokhin K.B., Soldatov P.E., Vinogradova O.L., Ilyin E.A., Sychev V.N. Experimental studies with mice on the program of the biosatellite BION-M1 mission. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and environmental medicine*. 2014;48(1):14-27.
- Andressoo J.O., Saarna M. Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2008;18:297-306.
- Atomi Y. Gravitational effects on human physiology. *Subcell. Biochem.* 2015;72:627-59.
- Aubert A.E., Beckers F., Verheyden B. Cardiovascular function and basics of physiology in microgravity. *Acta. Cardiol.* 2005;60:129-151.
- Baisch F.J. Head down tilt combined with breathing assistance by the "IRON LUNG." A new simulation model for cardiovascular deconditioning, skin, and kidney function in weightlessness? *J. Gravit. Physiol.* 2002;9:67-68.
- Basso N., Bellows C.G., Heersche J.N. Effect of simulated weightlessness on osteoprogenitor cell number and proliferation in young and adult rats. *Bone* 2005;36:173-183.
- Blaber E., Marçal H., Burns B.P. Bioastronautics: the influence of microgravity on astronaut health. *Astrobiology*. 2010;10:463-473.
- Chen J., Liu R., Yang Y., Li J., Zhang X., Li J., Wang Z., Ma J. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons. *Neurosci. Lett.* 2011;505(2):171-175.
- Clément G., Ngo-Anh J.T. Space physiology II: adaptation of the central nervous system to space flight – past, current, and future studies. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2013;113:1655-1672.
- Clément G., Reschke M.F. *Neuroscience in Space*. N.Y., Springer, 2008.
- Convertino V.A., Bloomfield S.A., Greenleaf J.E. An overview of the issues: physiological effects of bed rest and restricted physical activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1997;29:187-190.
- Cordero-Llana O., Houghton B.C., Rinaldi F., Taylor H., Yáñez-Muñoz R.J., Uney J.B., Wong L.F., Caldwell M.A. Enhanced efficacy of the CDNF/MANF family by combined intranigral overexpression in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Mol. Ther.* 2015;23:244-254.
- Culman J., Kvetnansky T., Serova L.V., Tigranjan R.A., Macho L. Serotonin in individual hypothalamic nuclei of rats after space flight on biosatellite Cosmos 1129. *Acta Astronaut.* 1985;12:373-376.
- Damjanoska K.J., Heidenreich B.A., Kindel G.H., D'Souza D.N., Zhang Y., Garcia F., Battaglia G., Wolf W.A., Van de Kar L.D., Muma N.A. Agonist-induced serotonin 2A receptor desensitization in the rat frontal cortex and hypothalamus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;309(3):1043-1050.
- Day J.R., Frank A.T., O'Callaghan J.P., DeHart B.W. Effects of microgravity and bone morphogenetic protein II on GFAP in rat brain. *J. Appl. Physiol.* 1998;85:716-722.
- DeFelipe J., Arellano J.I., Merchán-Pérez A., González-Albo M.C., Walton K., Llinás R. Spaceflight induces changes in the synaptic circuitry of the postnatal developing neocortex. *Cereb. Cortex*. 2002;12(8):883-891.
- Degan P., Sancandi M., Zunino A., Ottaggio L., Viaggi S., Cesarone F., Pippia P., Galleri G., Abbondandolo A. Exposure of human lymphocytes and lymphoblastoid cells to simulated microgravity strongly affects energy metabolism and DNA repair. *J. Cell Biochem.* 2005;94:460-469.
- De la Torre G.G. Cognitive neuroscience in space. *Life (Basel)*. 2014;4:281-294.
- Delp M.D. Unraveling the complex web of impaired wound healing with mechanical unloading and physical deconditioning. *J. Appl. Physiol.* 2008;104:1262-1263.
- Elinder F., Akanda N., Tofighi R., Shimizu S., Tsujimoto Y., Orrenius S., Ceccatelli S. Opening of plasma membrane voltage dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic stimuli. *Cell Death Differ.* 2005;12:1134-1140.
- Felix K., Wise K., Manna S., Yamauchi K., Wilson B.L., Thomas R.L., Kulkarni A., Pellis N.R., Ramesh G.T. Altered cytokine expression in tissues of mice subjected to simulated microgravity. *Mol. Cell Biochem.* 2004;266:79-85.
- Freed L.E., Pellis N., Searby N., de Luis J., Preda C., Bordonaro J., Vunjak-Novakovic G. Microgravity cultivation of cells and tissues. *Gravit. Space Biol. Bull.* 1999;12:57-66.
- Frigeri A., Iacobas D.A., Iacobas S., Nicchia G.P., Desaphy J.F., Camerino D.C., Svelto M., Spray D.C. Effect of microgravity on gene expression in mouse brain. *Exp. Brain Res.* 2008;191(3):289-300.
- Fujii M.D., Patten B.M. Neurology of microgravity and space travel. *Neurol. Clin.* 1992;10(4):999-1013.
- Grace A.A. Dopamine. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Eds. K.L. Davis, D. Charney, J.T. Coyle, C. Nemeroff. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2002:119-132.
- Hughes P.E., Alexi T., Walton M., Williams C.E., Dragunow M., Clark R.G., Gluckman P.D. Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 1999;57:421-450.
- Hughes-Fulford M. Physiological effects of microgravity on osteoblast morphology and cell biology. *Adv. Space Biol. Med.* 2002;8:129-157.
- Infanger M., Ulbrich C., Baatout S., Wehland M., Kreutz R., Bauer J., Grosse J., Vadrucchi S., Cogoli A., Derradji H., Neefs M., Kusters S., Spain M., Paul M., Grimm D. Modeled gravitational unloading induced downregulation of endothelin-1 in human endothelial cells. *J. Cell Biochem.* 2007;101:1439-1455.
- Kang C.Y., Li T., Zou L., Yuan M., Li T.Z., Guo Y.H., Wang Y., Liu C.T. Salidroside inhibits clinorotation-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011;31:649-652.
- Klein-Nulend J., Bacabac R.G., Veldhuijzen J.P., Van Loon J.J. Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Adv. Space Res.* 2003;32:1551-1559.
- Konstantinova N.A., Buravkova L.B., Manuilova E.S., Arsen'eva E.L., Grivennikov I.A. Effects of clinostating on the neuronal differentiation of embryonic stem cells from mouse strain R1. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and environmental medicine*. 2010;44(3):65-67.
- Kossmehl P., Shakibaei M., Cogoli A., Infanger M., Curcio F., Schonberger J., Eilles C., Bauer J., Pickenhahn H., Schulze-Tanzil G., Paul M., Grimm D. Weightlessness induced apoptosis in normal thyroid cells and papillary thyroid carcinoma cells via extrinsic and intrinsic pathways. *Endocrinology*. 2003;144:4172-4179.
- Kramar E.A., Bernard J.A., Gall C.M., Lynch G. Integrins modulate fast excitatory transmission at hippocampal synapses. *J. Biol. Chem.* 2003;278:10722-10730.
- Krasnov I.B. Hyponoradrenergic syndrome of weightlessness: its manifestations in mammals and possible mechanism. *Physiologist*. 1991;34(Suppl. 1):23-26.
- Krasnov I.B. Gravitational neuromorphology. *Adv. Space Biol. Med.* 1994;4:85-110.
- Kvetnansky R., Culman J., Serova L.V., Tigranjan R.A., Torda T., Macho L. Catecholamines and their enzymes in discrete brain areas of rats after space flight on biosatellites Cosmos. *Acta Astronaut.* 1983;10:295-300.
- Lelkes P.I., Galvan D.L., Hayman G.T., Goodwin T.J., Chatman D.Y., Cherian S., Garcia R.M., Unsworth B.R. Simulated microgravity conditions enhance differentiation of cultured PC12 cells towards the neuroendocrine phenotype. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 1998;34:316-325.

- Lindholm P., Saarma M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev. Neurobiol.* 2010;70:360-371.
- Lindholm P., Voutilainen M.H., Laurén J., Peränen J., Leppänen V.M., Andressoo J.O., Lindahl M., Janhunen S., Kalkkinen N., Timusk T., Tuominen R.K., Saarma M. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature.* 2007;448:773-77.
- Monticone M., Liu Y., Pujic N., Cancedda R. Activation of nervous system development genes in bone marrow derived mesenchymal stem cells following spaceflight exposure. *J. Cell Biochem.* 2010;111(2):442-452.
- Morey-Holton E.R., Globus R.K. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. *Bone.* 1998;22:83-88.
- Morey-Holton E.R., Globus R.K., Kaplansky A., Durnova G. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv. Space Biol. Med.* 2005;10:7-40.
- Nakamura H., Kumei Y., Morita S., Shimokawa H., Ohya K., Shinomiya K. Antagonism between apoptotic (Bax/Bcl-2) and antiapoptotic (IAP) signals in human osteoblastic cells under vectoraveraged gravity condition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;1010:143-147.
- Naumenko V.S., Kulikov A.V., Kondaurova E.M., Tsybko A.S., Kulikova E.A., Krasnov I.B., Shenkman B.S., Sychev V.N., Bazhenova E.Y., Sinyakova N.A., Popova N.K. Effect of actual long-term spaceflight on BDNF, TrkB, p75, BAX and BCL-XL genes expression in mouse brain regions. *Neuroscience.* 2015;284:730-736.
- Nichols H.L., Zhang N., Wen X. Proteomics and genomics of microgravity. *Physiol. Genomics.* 2006;26:163-171.
- Oganov V.S., Bogomolov V.V. Костная система человека в условиях невесомости. Human bone system in microgravity: review of research data, hypotheses and predictability of state in extended (exploration) missions. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina=Aerospace and environmental medicine.* 2009;1:3-12.
- Oganov V.S., Potapov A.N. Functional plasticity of mammalian skeletal muscles under microgravity. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina=Aerospace and environmental medicine.* 2006;1:27-36.
- Pascual A., Hidalgo-Figueroa M., Gómez-Díaz R., López-Barneo J. GDNF and protection of adult central catecholaminergic neurons. *J. Mol. Endocrinol.* 2011;46:83-92.
- Pascual A., Hidalgo-Figueroa M., Piruat J.T., Pintado C.O., Gómez-Díaz R., López-Barneo J. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat. Neurosci.* 2008;11:755-761.
- Popova N.K., Kulikov A.V., Kondaurova E.M., Tsybko A.S., Kulikova E.A., Krasnov I.B., Shenkman B.S., Bazhenova E.Y., Sinyakova N.A., Naumenko V.S. Risk neurogenes for long-term spaceflight: dopamine and serotonin brain system. *Mol. Neurobiol.* 2014;51(3):1443-1451.
- Popova N.K., Naumenko V.S. 5-HT1A receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Rev. Neurosci.* 2013;24(2):191-204.
- Regnard J., Heer M., Drummer C., Norsk P. Validity of microgravity simulation models on earth. *Am. J. Kidney Dis.* 2001;38:668-674.
- Rucci N., Migliaccio S., Zani B.M., Taranta A., Teti A. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved Rotating Wall Vessel bioreactor (RWV). *J. Cell Biochem.* 2002;85:167-179.
- Saavedra A., Baltazar G., Duarte E.P. Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights. *Prog. Neurobiol.* 2008;86:186-215.
- Santucci D., Kawano F., Ohira T., Terada M., Nakai N., Francia N., Alleva E., Aloe L., Ochiai T., Cancedda R., Goto K., Ohira Y. Evaluation of gene, protein and neurotrophin expression in the brain of mice exposed to space environment for 91 days. *PLoS One* 2012;7. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0040112/> (Accessed 09 July 2012).
- Sarkar P., Sarkar S., Ramesh V., Hayes B.E., Thomas R.L., Wilson B.L., Kim H., Barnes S., Kulkarni A., Pellis N., Ramesh G.T. Proteomic analysis of mice hippocampus in simulated microgravity environment. *J. Proteome Res.* 2006;5(3):548-553.
- Sarkar P., Sarkar S., Ramesh V., Kim H., Barnes S., Kulkarni A., Hall J.C., Wilson B.L., Thomas R.L., Pellis N.R., Ramesh G.T. Proteomic analysis of mouse hypothalamus under simulated microgravity. *Neurochem. Res.* 2008;33(11):2335-2341.
- Slenzka K. Neuroplasticity changes during space flight. *Adv. Space Res.* 2003;31:1595-1604.
- Sychev V.N., Ilyin E.A., Yarmanova E.N., Rakov D.V., Ushakov I.B., Kirilin A.N., Orlov O.I., Grigoriev A.I. The BION-M1 project: overview and first results. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina=Aerospace and environmental medicine.* 2014;48(1):7-14.
- Trappe T., Trappe S., Lee G., Widrick J., Fitts R., Costill D. Cardiorespiratory responses to physical work during and following 17 days of bed rest and spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 2006;100:951-957.
- Tsybko A.S., Ilchibaeva T.V., Kulikov A.V., Kulikova E.A., Krasnov I.B., Sychev V.N., Shenkman B.S., Popova N.K., Naumenko V.S. Effect of microgravity on glial cell line-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor gene expression in the mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 2015;93(9):1399-1404.
- Unsworth B.R., Lelkes P.I. Growing tissues in microgravity. *Nat. Med.* 1998;4:901-907.
- Uva B.M., Masini M.A., Sturla M., Bruzzone F., Giuliani M., Tagliafierro G., Strollo F. Microgravity-induced apoptosis in cultured glial cells. *Eur. J. Histochem.* 2002a;46(3):209-214.
- Uva B.M., Masini M.A., Sturla M., Prato P., Passalacqua M., Giuliani M., Tagliafierro G., Strollo F. Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res.* 2002b;934(2):132-139.
- Uva B.M., Masini M.A., Sturla M., Tagliafierro G., Strollo F. Microgravity-induced programmed cell death in astrocytes. *J. Gravit. Physiol.* 2002c;9(1):275-276.
- Van de Kar L.D., Javed A., Zhang Y., Serres F., Raap D.K., Gray T.S. 5-HT_{2A} receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *J. Neurosci.* 2001;21(10):3572-3579.
- Wang J., Zhang J., Bai S., Wang G., Mu L., Sun B., Wang D., Kong Q., Liu Y., Yao X., Xu Y., Li H. Simulated microgravity promotes cellular senescence via oxidant stress in rat PC12 cells. *Neurochem. Int.* 2009;55(7):710-716.
- Wise K.C., Manna S.K., Yamauchi K., Ramesh V., Wilson B.L., Thomas R.L., Sarkar S., Kulkarni A.D., Pellis N.R., Ramesh G.T. Activation of nuclear transcription factor-kappaB in mouse brain induced by a simulated microgravity environment. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2005;41(3-4):118-123.
- Zhang Y., Damjanoska K.J., Carrasco G.A., Dudas B., D'Souza D.N., Tetzlaff J., Garcia F., Hanley N.R., Scripithirathan K., Petersen B.R., Gray T.S., Battaglia G., Muma N.A., Van de Kar L.D. Evidence that 5-HT_{2A} receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate neuroendocrine responses to (-)DOI. *J. Neurosci.* 2002;22(21):9635-9642.

5-HT_{1A} рецептор: роль в регуляции различных видов поведения

В.С. Науменко¹✉, Е.Г. Понимаскин², Н.К. Попова¹

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

² Институт клеточной нейрофизиологии, Высшая медицинская школа Ганновера, Ганновер, Германия

Нейромедиатор мозга серотонин регулирует различные формы как нормального, так и патологического поведения, действуя на 14 типов серотониновых (5-HT) рецепторов. Все 5-HT рецепторы, за исключением 5-HT₃, представляющего ионный канал (ионотропный рецептор), принадлежат к суперсемейству метаболитических рецепторов, сопряженных с G-белками. Каждый из типов и подтипов рецепторов характеризуется уникальным контролирующим геном, спектром сродства к разнообразным агонистам и антагонистам серотонина, специфическим распределением в мозге и рядом регулируемых функций. Среди этого многообразия 5-HT рецепторов особый интерес вызывает эволюционно наиболее древний 5-HT_{1A} рецептор, играющий ключевую роль в ауторегуляции серотониновой системы мозга. Эта роль 5-HT_{1A} рецепторов обусловлена особенностями их локализации (пост- или пресинаптически на 5-HT нейронах), в зависимости от которой они могут оказывать прямо противоположное действие на функциональную активность 5-HT системы. Обзор посвящен данным литературы и результатам, полученным авторами, о факторах, регулирующих экспрессию и функциональную активность 5-HT_{1A} рецепторов, и их влиянии на поведение. Описана структура гена 5-HT_{1A} рецептора, приведены новейшие данные о посттрансляционной регуляции активности 5-HT_{1A} рецепторов и взаимодействии 5-HT рецепторов. Особое внимание уделено роли гетеромеризации 5-HT_{1A} рецептора при его взаимодействии с 5-HT₇ серотониновым рецептором с образованием гетеродимера и функциональной инактивации 5-HT_{1A} рецептора. Показано участие 5-HT_{1A} рецепторов в регуляции агрессивного поведения, каталепсии, тревожности, депрессии и уникальной природной адаптации – зимней спячки. Особое внимание уделено участию этих рецепторов в регуляции 1) вызванной страхом защитно-оборонительной агрессии по отношению к человеку – основы процесса доместикации; 2) межсамцов (intermale) агрессии по отношению к сопернику (конкуренту), приводящей к установлению отношения доминант – субординант в сообществе животных и лежащей в основе асоциального поведения человека; 3) механизмов депрессии и действия клинически эффективных антидепрессантов группы ингибиторов обратного захвата серотонина. Выдвинута гипотеза о роли 5-HT_{1A}/5-HT₇ гетеродимеризации в механизме действия антидепрессантов.

Ключевые слова: серотонин; 5-HT_{1A} рецептор; 5-HT₇ рецептор; взаимодействие серотониновых рецепторов; тревожность; депрессивное поведение; агрессивное поведение; реакция замирания; зимняя спячка.

5-HT_{1A} receptor: its role in the regulation of different kinds of behavior

V.S. Naumenko¹✉, E.G. Ponimaskin², N.K. Popova¹

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

² Institute of Cellular Neurophysiology, Hannover Medical High School, Hannover, Germany

Brain serotonin (5-HT) is known to be involved in the control of a wide range of physiological functions as well as of different kinds of behavior. Such polyfunctionality of 5-HT is mediated by numerous 5-HT receptors. Currently, 14 different 5-HT receptor subtypes expressed in the mammals have been identified. The 5-HT_{1A} receptor is one of the most extensively characterised members of the serotonin receptor family. Increased interest to the 5-HT_{1A} receptor is based on (1) a key role in the autoregulation of the brain serotonergic system due to the postsynaptic and presynaptic localization, (2) a great body of data demonstrating implication of 5-HT_{1A} receptor in the control of various physiological functions (3) involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mechanisms of depression, anxiety and suicide. The review describes literature and original data on factors affecting the expression and functional activity of 5-HT_{1A} receptors and the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the regulation of normal and pathological behavior. The structure of the 5-HT_{1A} receptor gene is described and new data on the posttranslational regulation of 5-HT_{1A} receptor functional activity are provided. A special focus was given to the interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors followed by heterodimer formation and the role of heterodimerization in the functional inactivation of the 5-HT_{1A} receptor. The implication of 5-HT_{1A} receptors in the regulation of aggressive behavior, catalepsy, anxiety, depression and hibernation was shown. Special attention is focused on the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the regulation of 1) fear-induced aggression towards man –

the basis of domestication, 2) intermale aggression underling asocial behavior in men, 3) depression and in the mechanism of antidepressant action. The described data extend the idea on the 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system.

Key words: serotonin; 5-HT_{1A} receptor; 5-HT₇ receptor; serotonin receptors interaction; anxiety; depressive behavior; aggressive behavior; catalepsy; hibernation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Науменко В.С., Понимаскин Е.Г., Попова Н.К. 5-HT_{1A} рецептор: роль в регуляции различных видов поведения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):180-190. DOI 10.18699/VJ16.135

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Naumenko V.S., Ponimaskin E.G., Popova N.K. 5-HT_{1A} receptor: its role in the regulation of different kinds of behavior. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):180-190. DOI 10.18699/VJ16.135

Прошло более полувека с тех пор, как в мозге млекопитающих была обнаружена система нейронов, в которых синтезируется и осуществляет передачу нервного импульса биогенный амин серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-HT). За это время накоплено огромное число данных, свидетельствующих о вовлечении этого медиатора в регуляцию многочисленных функций ЦНС, таких как терморегуляция, центральная регуляция секреции эндокринных желез, реакция на стресс, аппетит и жажда. Кроме того, 5-HT контролирует выраженность многих форм как нормального, так и патологического поведения.

Поразительная полифункциональность серотонина обусловлена, прежде всего, наличием многочисленных рецепторов, опосредующих воздействие этого медиатора на нейроны (Saudou, Hen, 1994; Попова, Науменко, 2010). К настоящему времени с помощью молекулярно-биологических методов выявлено и клонировано 14 различных типов генов и контролируемых ими серотонергических (5-HT) рецепторов, экспрессирующихся в мозге млекопитающих. Классификация 5-HT рецепторов основана на трех принципах: 1) особенностях первичной структуры; 2) механизмах трансдукции сигнала и 3) фармакологическом профиле (селективные агонисты и антагонисты рецептора) (Humphrey et al., 1993; Humphrey, Barnard, 1998). По этим принципам 5-HT рецепторы классифицированы в 7 основных типов и 7 подтипов (Saudou, Hen, 1994; Barnes, Sharp, 1999).

Большинство 5-HT рецепторов принадлежат к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белками. Каждый из них представляет собой полипептидную цепь, содержащую семь трансмембранных доменов, образующих совместно с внеклеточными петлями и N-концом участок связывания медиатора. Третья цитоплазматическая петля и C-конец осуществляют сопряжение с G-белком. При связывании медиатора происходит изменение конформации рецептора, приводящее к диссоциации G-белка на β -, γ - и α -субъединицы. Эти субъединицы обладают каталитической активностью, благодаря которой способны изменять внутриклеточные процессы (Saudou, Hen, 1994; Gerhardt, van Heerikhuizen, 1997; Barnes, Sharp, 1999).

Каждый из типов и подтипов рецепторов характеризуется уникальным контролирующим геном, спектром

сродства к разнообразным агонистам и антагонистам серотонина, специфическим распределением в мозге и определенным спектром функций, которые он регулирует.

Среди такого разнообразия серотониновых рецепторов привлекает внимание 5-HT_{1A} подтип. Это обусловлено рядом причин, основными из которых являются: 1) ключевая роль в ауторегуляции 5-HT системы в мозге (Barnes, Sharp, 1999; Blier, Ward, 2003; Popova, Naumenko, 2013). 5-HT_{1A} рецепторы отличаются от других видов 5-HT рецепторов тем, что они локализованы как пост-, так и пресинаптически на 5-HT нейронах, и в зависимости от локализации могут оказывать прямо противоположное действие; 2) экспериментальные данные о вовлечении 5-HT_{1A} рецепторов в регуляцию разнообразных форм как нормального, так и патологического поведения; 3) многочисленные данные об участии 5-HT_{1A} рецепторов в механизме патологической тревожности и депрессии (Fuller, 1991; Heisler et al., 1998; Ramboz et al., 1998; Overstreet et al., 2003; Kaufman et al., 2015), подтвержденные клинической эффективностью агонистов 5-HT_{1A} рецепторов как анксиолитиков и антидепрессантов (Robinson et al., 1989; Rakel, 1990; De Vry, 1995); 4) наличие селективных агонистов и антагонистов 5-HT_{1A} рецепторов.

Из-за многообразия функций 5-HT_{1A} рецепторов встает вопрос об их генетической и посттрансляционной регуляции, связи предрасположенности к патологическому поведению с особенностями генетического контроля, плотности и функциональной активности этих рецепторов. В этом обзоре будут обсуждены данные литературы и собственных исследований, касающиеся генетических подходов к исследованию 5-HT_{1A} рецепторов и их участия в регуляции поведения.

5-HT_{1A} серотониновый рецептор

5-HT_{1A} рецептор является эволюционно одним из самых древних. Считается, что он образовался около 800 млн. лет назад, задолго до появления позвоночных животных (Peroutka, Howell, 1994). Он обнаружен у насекомых (Dacks et al., 2006), плоских червей (Creti et al., 1992), круглоротых (Hill et al., 2003) и всех классов позвоночных животных.

5-HT_{1A} подтип относится к группе рецепторов 5-HT₁ типа, которая также включает в себя 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B},

5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} и 5-HT_{1F} подтипы, проявляющие от 40 до 63 % структурной гомологии с 5-HT_{1A} рецептором (Barnes, Sharp, 1999). Рецепторы 5-HT₁ типа сопряжены с Gi-белком и при активации ингибируют аденилатциклазу – фермент, катализирующий превращение АТФ в цАМФ, что является сигналом для активации цАМФ-зависимых протеинкиназ, которые в свою очередь активируют различные белки (в том числе факторы транскрипции). Кроме того, активация 5-HT₁ рецепторов приводит к открытию K⁺ каналов и гиперполяризации мембраны. Имеются данные о том, что активация рецептора 1A подтипа в культурах клеток может приводить к активации фосфолипазы C (Albert et al., 1999).

Рецепторы 5-HT_{1A} подтипа широко представлены в центральной нервной системе, в особенности в миндалевидном комплексе, гиппокампе, перегородке и ядрах шва среднего мозга. Наивысший уровень мРНК и наибольшая плотность 5-HT_{1A} рецепторов обнаружены в гиппокампе (Barnes, Sharp, 1999). В ядрах шва 5-HT_{1A} рецепторы выступают в роли соматодендритных ауторецепторов, ингибируя нейрональную активность и секрецию 5-HT в синаптическую щель (Aghajanian, 1995). 5-HT_{1A} рецепторы, локализованные постсинаптически, в том числе и на несеротонергических нейронах, действуют характерным для активации 5-HT системы образом, в том числе модулируя выделение других нейротрансмиттеров (Zifa, Fillion, 1992).

Структура гена и факторы, влияющие на экспрессию и функциональную активность 5-HT_{1A} рецептора

5-HT_{1A} рецептор оказался первым серотониновым рецептором, ген которого был идентифицирован. Это произошло почти 30 лет назад при скрининге геномной библиотеки человека с целью поиска гомологов β2-адренергического рецептора (Kobilka et al., 1987). Гибридизация в условиях низкой селективности выявила ген, демонстрирующий 43 % гомологии с геном β2-адренергического рецептора человека. Вскоре было доказано, что ген *G2I* кодирует 5-HT_{1A} рецептор (Fargin et al., 1988). Позже гомологичные гены были клонированы у крысы (Albert et al., 1990) и мыши (Charest et al., 1993). Показано, что ген 5-HT_{1A} рецептора локализован на 5-й хромосоме человека (Kobilka et al., 1987) и 13-й хромосоме мыши (Oakey et al., 1991).

5-HT_{1A} рецептор представляет собой полипептидную цепь, образующую семь трансмембранных доменов и состоящую из 422 аминокислотных остатков у крысы и 421 – у человека (Fargin et al., 1988; Zifa, Fillion, 1992). Этот рецептор характеризуется коротким внутриклеточным С-концом и длинной третьей внутриклеточной петлей, на которой локализован сайт фосфорилирования протеинкиназой С. Была показана связь между фосфорилированием и десенситизацией рецептора (Raymond, 1991), что дало основание полагать, что функция 5-HT_{1A} рецепторов находится под контролем 5-HT₂ рецепторов, вторичным посредником которых является протеинкиназа С (Zifa, Fillion, 1992; Zhang et al., 2001). Кроме того, в третьей цитоплазматической петле имеются два сайта связывания с кальмодулином, связывание которого является сигналом

для интернализации рецептора (Turner et al., 2004). Еще одной особенностью структуры рецептора А подтипа является наличие «лейциновых застёжек» (leucine zipper), посредством которых, возможно, осуществляются белок-белковые взаимодействия между 5-HT_{1A} и 5-HT₂ рецепторами (Zifa, Fillion, 1992). Все эти особенности структуры 5-HT_{1A} рецептора приоткрывают возможные пути воздействия на его экспрессию, в том числе другими 5-HT рецепторами.

Факторы, влияющие на экспрессию рецептора, могут, по-видимому, действовать и на уровне транскрипции. В 1999 году была описана структура промотора гена 5-HT_{1A} рецептора (Storring et al., 1999). Было показано, что основной сайт инициации транскрипции локализован в положении –967 п. н. от стартового кодона AUG. У крыс этот сайт ассоциирован с выше расположенными ТАТА-боксами, однако у мышей ТАТА-боксы отсутствуют. Принимая во внимание сходство этих животных в экспрессии рецептора и ее регуляции, авторы предположили, что ТАТА-боксы не играют существенной роли в регуляции транскрипции гена 5-HT_{1A} рецептора (Storring et al., 1999). Кроме того, в промоторе было обнаружено наличие селективного энхансера (enhancer) (между –426 и –117 п. н.), неселективного (между –1519 и –426 п. н.) и сильного селективного сайленсера (silencer) (между –1590 и –1519 п. н.) (Storring et al., 1999; Ou et al., 2000). Из этих элементов наиболее интересным является сайленсер, поскольку в случае его делеции транскрипция гена усиливается более чем в 10 раз. Поэтому было предположено, что регуляция экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора на уровне транскрипции осуществляется, вероятно, в основном за счет репрессии (Ou et al., 2000). Таким образом, наряду с генетическим контролем интенсивности синтеза 5-HT_{1A} рецепторов существуют и другие уровни регуляции их функциональной активности.

Имеются сведения о негативной регуляции транскрипции гена 5-HT_{1A} рецептора глюко- и минералокортикоидами, которые могут действовать, по-видимому, двумя путями: а) путем связывания глюкокортикоидами (но не минералокортикоидами) определенных последовательностей ДНК (NF-κB: nuclear factor-κB), оказывающих в свободном состоянии активирующее влияние на транскрипцию гена 5-HT_{1A} рецептора (NF-κB-зависимый механизм) (Wissink et al., 2000); б) гетеродимеризацией как глюко-, так и минералокортикоидных рецепторов на специфических элементах nMRE/GRE (negative Mineralocorticoid Response Element/Glucocorticoid Response Element) в промоторе гена 5-HT_{1A} рецептора (Ou et al., 2001).

В последние годы к выявленным ранее механизмам регуляции 5-HT_{1A} рецептора добавлены новые, связанные с олигомеризацией и взаимодействием 5-HT рецепторов. Было установлено, что 5-HT_{1A} рецептор существует в мозге в нескольких формах: как 5-HT_{1A} мономер, 5-HT_{1A}/5-HT_{1A} гомодимер и гетеродимер, связанный с другими рецепторами (Woehler et al., 2009; Kobe et al., 2012; Renner et al., 2012). Новые данные о роли димеризации в регуляции функциональной активности 5-HT_{1A} рецептора получены при изучении взаимодействия 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов (Renner et al., 2012; Popova, Naumenko, 2013; Naumenko

et al., 2014). Оказалось, что гетеродимер 5-HT_{1A}/5-HT₇, не оказывая влияния на функциональные свойства 5-HT₇ рецептора, модулирует два основных фактора десенситизации 5-HT_{1A} рецепторов: ослабляет их функциональную активность и увеличивает интенсивность интернализации. Таким образом, ключевой регулятор 5-HT системы мозга, 5-HT_{1A} рецептор, сам зависит от 5-HT₇ рецепторов, которые, образуя с ним димерные комплексы, ведут к функциональной инактивации. Это совершенно новая и важная роль 5-HT₇ рецептора и его взаимодействия (cross-talk) с 5-HT_{1A} рецептором позволяет по-новому взглянуть на проблему механизма депрессии и действия антидепрессантов группы ингибиторов обратного захвата серотонина.

Поведение, регулируемое 5-HT_{1A} рецепторами

Среди контролируемых 5-HT_{1A} рецепторами видов поведения наибольшее внимание привлекают депрессивноподобное поведение, тревожность и агрессивное поведение.

Тревожность и депрессивное поведение

Мыши с нокаутом 5-HT_{1A} гена характеризуются повышенным уровнем тревожности, что, без сомнения, доказывает связь исследуемого подтипа рецепторов и данной формы поведения (Heisler et al., 1998; Ramboz et al., 1998; Zhuang et al., 1999; Deng et al., 2007). Кроме того, это подтверждается анксиолитическим, т.е. противотревожным действием селективных агонистов 5-HT_{1A} рецепторов (Robinson et al., 1989; Rakel, 1990; De Vry, 1995; Handley, 1995; Sun et al., 2015). Сниженная плотность 5-HT_{1A} рецепторов была обнаружена у людей, страдающих социофобией (Lanzenberger et al., 2007).

Поскольку агонисты 5-HT_{1A} рецепторов проявляют выраженные антидепрессивные свойства (Robinson et al., 1989; Rakel, 1990; De Vry, 1995), особое внимание направлено на изучение роли 5-HT_{1A} рецепторов в механизмах депрессии. Очевидно, что полной аналогии депрессии у человека и животных нет, поэтому в экспериментальных моделях используется более осторожный термин «депрессивноподобное поведение», а основным его показателем служит неподвижность в тесте принудительного плавания Порсолта. Показано, что агонисты 5-HT_{1A} рецепторов, проявляющие антидепрессивные свойства, снижают время неподвижности в тесте Порсолта (Estrada-Camarena et al., 2006; Maurel et al., 2007).

Во множестве работ показано снижение плотности и/или чувствительности 5-HT_{1A} рецепторов и экспрессии кодирующего их гена у человека с депрессивными расстройствами, обезьян с депрессивноподобным поведением (Hansenne et al., 2002; Sibille et al., 2004; Shively et al., 2006; Drevets et al., 2007), а также крыс, подвергаемых непредсказуемому стрессу, приводящему к развитию депрессивноподобного состояния (Lopez et al., 1998). Снижение плотности рецепторов у людей с депрессивными расстройствами подтверждено при помощи позитронно-эмиссионной томографии (Hirvonen et al., 2008). При исследовании действия антидепрессантов было обнаружено, что они препятствуют происходящему при депрессии

снижению плотности и чувствительности 5-HT_{1A} рецепторов и экспрессии кодирующего их гена (Lopez et al., 1998). А. Альберт и С. Лемонде выдвинули гипотезу, что именно понижение плотности пресинаптических 5-HT_{1A} рецепторов приводит через 3–4 недели лечения антидепрессантами к повышению сниженной при депрессии функциональной активности 5-HT системы (Albert, Lemonde, 2004). Это общепринятое в настоящее время объяснение отсроченного клинического эффекта этих препаратов. Однако оно предполагает разную чувствительность пре- и постсинаптических 5-HT_{1A} рецепторов к хроническому действию антидепрессантов. Поскольку эти рецепторы структурно идентичны, избирательная или, по крайней мере, значительно более высокая чувствительность постсинаптических 5-HT_{1A} рецепторов к действию 5-HT на фоне хронического введения антидепрессантов не находила объяснения, оставаясь слабым местом гипотезы Альберта и Лемонде. И лишь новейшие данные, полученные международным коллективом исследователей, дают объяснение этой загадке (Renner et al., 2012; Popova, Naumenko, 2013; Naumenko et al., 2014). В основе лежат недавно установленные факты о взаимодействии и олигодимеризации 5-HT рецепторов: 1) 5-HT_{1A} рецептор может образовывать гетеродимер с 5-HT₇ рецептором; 2) гетеродимеризация 5-HT_{1A}/5-HT₇ рецепторов сопровождается снижением функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов; 3) основным путем инактивации 5-HT_{1A} рецептора в ответ на хроническое воздействие является интернализация – перемещение рецептора внутрь клетки с утратой возможности реагировать на нейротрансмиттер. Интернализация же 5-HT_{1A} рецептора осуществляется в виде 5-HT_{1A}/5-HT₇ гетеродимера в ответ на стимуляцию 5-HT₇ рецептора; 4) плотность 5-HT₇ рецепторов в разных структурах взрослого мозга млекопитающих неодинакова: в структурах мозга с постсинаптической локализацией 5-HT_{1A} рецепторов она ниже, чем в области ядер шва среднего мозга с пресинаптической локализацией этих рецепторов, что обуславливает разное количество образующихся гетеродимеров и, соответственно, разную интенсивность инактивации 5-HT_{1A} рецепторов. На основе этих данных было сформулировано следующее представление о функциональной роли 5-HT_{1A}/5-HT₇ гетеродимеризации (Naumenko et al., 2014). В физиологических условиях количество 5-HT_{1A}/5-HT₇ гетеродимеров в пресинаптических нейронах выше, чем в постсинаптических, в которых преобладают гомодимеры, состоящие из двух молекул 5-HT_{1A} рецептора. Это является основой различной чувствительности к медиатору пре- и постсинаптических нейронов и ее изменений при хроническом действии антидепрессантов группы ингибиторов обратного захвата серотонина. Интернализация 5-HT_{1A}/5-HT₇ рецепторных комплексов в пресинаптических терминалях в ответ на действие 5-HT, количество которого увеличивается при блокаде 5-HT транспортера, приводит к ослаблению ингибирующего действия пресинаптических 5-HT_{1A} рецепторов на серотониновую систему, повышению ее функциональной активности за счет усиления функционального вклада постсинаптического звена системы и ослаблению проявлений депрессии.

Несколько исследований связывают полиморфизм C(–1019)G в промоторе гена 5-HT_{1A} рецептора с повышенным риском суицида (Lemondet et al., 2003; Sawiniec et al., 2007). Показано, что плотность 5-HT_{1A} в префронтальной коре повышена у большинства жертв суицида (Sibille et al., 2004), в то же время четко продемонстрирована пониженная эффективность сопряжения 5-HT_{1A} рецептора с G-белком в мозге самоубийц (Hsiung et al., 2003). Считается также, что с этим полиморфизмом связана чувствительность к антидепрессантам. Хотя в одной из первых работ этой связи обнаружено не было (Serretti et al., 2004), в последующих было показано, что особи, гомозиготные по G-аллелю, менее чувствительны к антидепрессантам (Lemondet et al., 2004).

Агрессивное поведение

Механизмы регуляции агрессивного поведения остаются одной из центральных проблем нейрогенетики по двум основным причинам: 1) повышенная агрессивность человека лежит в основе асоциального и криминального поведения (Blanchard et al., 1999) и 2) низкая агрессивность или ее отсутствие являются неперенным условием важнейшего эволюционного события – доместикации животных. Одним из первых идею о том, что доместикация в древние времена представляла фактически бессознательный отбор на низкую агрессивность по отношению к человеку, высказал и развил Д.К. Беляев (Belyaev, 1979). Агрессивность по отношению к человеку относят к вызванной страхом защитно-оборонительной агрессии (fear-induced, defensive aggression) (Maxson, 1999). Другой распространенный вид агрессии, межсамцовая (intermale) агрессия по отношению к сопернику (конкуренту) (Moyer, 1968), приводит к установлению отношения доминант–субординант (Maxson, 1999).

С помощью радиолигандного специфического рецепторного связывания R. Hammer с коллегами (Hammer et al., 1992) показали снижение плотности 5-HT_{1A} рецепторов в среднем мозге и повышение ее в гиппокампе у крыс лабораторной линии, не подвергавшихся намеренной селекции на сниженную агрессивность, по сравнению с пойманными дикими животными.

Отсутствие связи доместикации собаки с двумя однонуклеотидными заменами в кодирующей части гена 5-HT_{1A} рецептора (G65T и A808C) и микросателлитным повтором СА, расположенным в 3'-некодирующей области, показали van den Berg с коллегами (van den Berg et al., 2005).

Беспрецедентным исследованием механизмов оборонительной реакции на человека, тесно связанной с процессом доместикации животных, является проводимая в ИЦиГ СО РАН многолетняя селекция серебристо-черных лисиц (Трут, 1969, 1978) и диких серых крыс-пасюков (Беляев, Бородин, 1982; Никулина и др., 1985а; Plyusnina, Oskina, 1997) на отсутствие агрессивности и повышенную агрессивность по отношению к человеку. В наших предыдущих исследованиях, проведенных на селекционированных на высокую или низкую агрессивность по отношению к человеку крысах-пасюках (Porova et al., 1991а), серебристо-черных лисицах (Porova et al., 1991б)

и норках (Никулина и др., 1985б), было впервые установлено, что основа доместикации – селекция на отсутствие вызванной страхом агрессии – связана со значительными изменениями в 5-HT системе мозга.

Нами была определена плотность 5-HT_{1A} рецепторов в мозге крыс, селекционированных в течение 40 (Porova et al., 1998), а позднее 59 поколений (Porova et al., 2005) на высокую агрессивность по отношению к человеку и ее отсутствие. Было показано повышение плотности этих рецепторов во фронтальной коре, гипоталамусе и миндалевидном комплексе неагрессивных крыс, в то время как ни в гиппокампе, ни в среднем мозге изменений плотности рецепторов не было обнаружено.

На крысах 59-го поколения селекции было также проведено исследование экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора в структурах мозга и функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов (Porova et al., 2005). Были выявлены существенные различия между высокоагрессивными и неагрессивными крысами. С использованием двух тестов на функциональную активность 5-HT_{1A} рецептора, вызываемую агонистом 8-ОН-ДПАТ гипотермической реакции, и теста сокращения нижней губы (lower lip retraction) показано, что доместикация крыс связана с повышением чувствительности 5-HT_{1A} рецепторов, что хорошо согласуется с повышенным уровнем мРНК 5-HT_{1A} рецептора в среднем мозге и более высокой, чем у агрессивных крыс, плотностью 5-HT_{1A} рецепторов во фронтальной коре, гипоталамусе и миндалевидном комплексе. В свою очередь, вызванная страхом высокая агрессивность связана со снижением экспрессии гена, контролирующего 5-HT_{1A} рецептор, и уменьшением плотности и функциональной активности этих рецепторов.

Различия в экспрессии гена, кодирующего 5-HT_{1A} рецептор в мозге агрессивных и неагрессивных животных, были показаны на мышах и свиньях. Отмечено значительное повышение экспрессии гена и плотности рецепторов в миндалевидном комплексе агрессивных молодых самок домашних свиней (D'Eath et al., 2005) и в гиппокампе и коре, но не в других структурах мозга агрессивных мышей (Korte et al., 1996).

Отметим, что в становлении агрессивного фенотипа основным является вклад генотипа, роль же средовых влияний в раннем онтогенезе относительно невелика. Это было показано в опытах с перекрестным вскармливанием (cross-fostering) у крыс, проведенных И.Ф. Плюсниной и сотрудниками лаборатории нейрогенетики поведения ИЦиГ СО РАН (Plyusnina et al., 2009). Различия в агрессивности между крысятами агрессивной и неагрессивной линий проявляются рано, уже в 15-дневном возрасте. В этом же возрасте крысята агрессивной линии отличаются, как и взрослые агрессивные крысы, пониженной функциональной чувствительностью 5-HT_{1A} рецепторов, хотя характерные для половозрелых крыс различия в экспрессии гена и плотности этих рецепторов еще не проявляются (Naumenko et al., 2013).

Агонисты 5-HT_{1A} рецепторов вызывают дозозависимое снижение интенсивности межсамцовой агрессии у мышей, крыс (Olivier et al., 1995; Edwards, Kravitz, 1997; Abe et al., 1998; De Boer et al., 1999, 2000; Mendoza et al., 1999;

Pruus et al., 2000; Stein et al., 2013), кошек (Hassanain et al., 2003), певчих овсянок (Sperry et al., 2003), хомяков (Ricci et al., 2006), человека (Lai et al., 2003) и рыб (Clotfelter et al., 2007). Дифференцировать эффекты стимуляции как пре-, так и постсинаптических 5-HT_{1A} рецепторов пока не удается.

Таким образом, исследования, проведенные с помощью фармакологических методов, а именно с использованием селективных агонистов и антагонистов 5-HT_{1A} рецепторов, показали, что этот подтип 5-HT рецепторов участвует в регуляции межсамцовой агрессии. Однако мыши с инaktivированным нокаутом геном 5-HT_{1A} рецептора демонстрируют только повышенную тревожность и отсутствие каких-либо изменений в этом виде агрессивного поведения (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Boutrel et al., 2002).

Интересны исследования 5-HT_{1A} рецепторов у мышей с нокаутом гена, кодирующего MAO-A – основной фермент метаболизма серотонина в мозге (линия Tg8). Примечательно, что нокаут MAO-A приводит у мышей к увеличению агрессивности (Cases et al., 1995; Porova et al., 2001), а соответствующая мутация у человека – к асоциальному и криминальному поведению (Brunner et al., 1993). У мышей линии Tg8, характеризующихся повышенной межсамцовой агрессией (Cases et al., 1995), отмечено увеличение уровня серотонина и снижение уровня его метаболита, 5-гидрооксииндолуксусной кислоты, в различных структурах мозга (Cases et al., 1995; Попова, 2004). Кроме того, были выявлены понижение чувствительности 5-HT_{1A} рецепторов и небольшое снижение их плотности в области ядер шва, но не в других структурах мозга (Evgard et al., 2002). В наших работах показано снижение функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов в мозге мышей линии Tg8, а также то, что генетический нокаут MAO-A приводит к увеличению экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора в миндалевидном комплексе и коре мозга (Науменко и др., 2005; Naumenko et al., 2005).

Реакция замирания

Другим видом вызванного страхом защитно-оборонительного поведения является реакция замирания, которая представляет собой состояние длительной обездвиженности с пластическим (катаlepsия) или ригидным (кататония) тонусом мускулатуры. Животное или человек в состоянии катаlepsии не способны длительное время изменять приданную им неудобную позу.

У высших позвоночных катаlepsия является разновидностью пассивно-оборонительной реакции затаивания при появлении хищника или какой-либо иной угрозы (Попова, 1997; Porova, 1997; Dixon, 1998; Porova, 1999). У некоторых млекопитающих субординантный самец, будучи атакован более агрессивным сородичем, демонстрирует катаlepsиподобную неподвижность (Dixon, 1998). У человека в выраженной форме катаlepsия наблюдается при некоторых тяжелых формах нервных и психических патологий (Singerman, Raheja, 1994; Sanberg et al., 1988) или как негативный эффект лечения нейролептиками (Fricchione, 1985).

Известно, что селективный агонист 5-HT_{1A} рецепторов, 8-ОН-ДПАТ, существенно подавляет выраженность

фармакологической морфиновой (Broekkamp et al., 1988) и галоперидоловой (Broekkamp et al., 1988; Haleem et al., 2004) катаlepsии у крыс и спонтанной катаlepsии у мышей (Miyata et al., 2007). В ИЦиГ СО АН СССР д.б.н. В.Г. Колпаковым с коллегами была проведена успешная селекция крыс аутбредной популяции Вистар на высокую предрасположенность к спонтанной катаlepsии (Барыкина и др., 1983). Высокий уровень катаlepsии (50–60 % катаlepsитиков) у крыс полученной линии ГК (генетические катаlepsитики) сохраняется в течение уже более 50 поколений. Сотрудники лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ показали снижение плотности 5-HT_{1A} рецепторов во фронтальной коре и стриатуме крыс, селекционированных на высокую предрасположенность к катаlepsии (Porova et al., 1998).

Еще одной лабораторной моделью нефармакологической катаlepsии является щипковая (pinch-induced) катаlepsия мышей. Было показано, что у некоторых мышей катаlepsиподобная неподвижность развивается после серии последовательных щипков кожи загривка (Amir et al., 1981). В лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН была создана линия мышей (Antidepressant Sensitive Cataleptics, ASC) с повышенной предрасположенностью к данному типу защитного поведения (Kondaurova et al., 2006). Мыши линии ASC были получены в результате селекции на повышенную катаlepsию из популяции беккроссов между мышами некатаlepsитической (AKR) и катаlepsитической (CBA) линий. При исследовании новой линии с помощью микросателлитного анализа (QTL) был обнаружен участок, локализованный на 13-й хромосоме и связанный с наследованием катаlepsии. Продемонстрировано, что этот участок включает наряду с несколькими другими ген 5-HT_{1A} рецептора и наследуется мышами линии ASC от мышей катаlepsитической линии CBA (Куликов, Базовкина, 2003; Куликов и др., 2003; Kulikov et al., 2003; Kondaurova et al., 2006). Кроме того, мы показали, что как повышенная предрасположенность к катаlepsии (линия CBA), так и селекция на эту предрасположенность (линия ASC) связаны с повышенной функциональной активностью 5-HT_{1A} рецепторов. В то же время у мышей линии CBA экспрессия гена 5-HT_{1A} рецептора была снижена по сравнению с мышами некатаlepsитической линии AKR, а у мышей линии ASC она существенно не отличалась от родительских линий (Науменко и др., 2006; Naumenko et al., 2006).

Зимняя спячка

Зимняя спячка представляет собой сочетание периодически возникающего глубокого и длительного сна с глубокой гипотермией. Это поразительное эволюционное адаптивное поведение, позволяющее животным пережить без воды и пищи долгие суровые зимние месяцы. Ритм сердца в спячке составляет около 2–5 % от частоты сокращений при нормальной температуре тела. Температура тела может снижаться до 3–1,5 °C, т.е. более чем на 30 °C. Ранее нами была установлена ключевая роль 5-HT в возникновении и поддержании зимней спячки (Попова и др., 1978). Среди 5-HT рецепторов внимание привлекают 5-HT_{1A}, 5-HT₃ и 5-HT₇ рецепторы, активация которых их селек-

тивными агонистами (m-CPBG и LP44 соответственно) вызывает глубокое падение температуры тела (Naumenko et al., 2009; Naumenko et al., 2011). 5-HT интересен еще и тем, что, кроме гипотермического действия на терморегуляцию (Hjorth, 1985; Goodwin et al., 1987), он принимает участие и в регуляции сна. Действительно, селективный агонист 5-HT_{1A} рецепторов, 8-ОН-ДПАТ, ингибирует парадоксальную фазу сна у мышей и крыс (Pora et al., 2006), а 5-HT_{1A} антагонист препятствует этому ингибированию (Monti, Jantos, 2004).

Какие-либо данные о роли в механизмах зимней спячки 5-HT₃ и 5-HT₇ рецепторов отсутствуют. В то же время нами выявлено существенное увеличение плотности 5-HT_{1A} рецепторов в гиппокампе, среднем мозге, полосатом теле и во фронтальной коре сусликов, находящихся в состоянии зимней спячки, по сравнению с бодрствующими животными. Мы впервые секвенировали фрагмент гена, кодирующего 5-HT_{1A} рецептор зимоспящих длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*), и обнаружили вставку трех нуклеотидов в участке гена, кодирующем третью цитоплазматическую петлю рецептора. Кроме того, были найдены значительные структуроспецифичные изменения экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора в мозге сусликов, находящихся в различных фазах цикла сон–бодрствование. Оказалось, что экспрессия исследуемого гена остается относительно высокой в течение зимней спячки, что, несомненно, свидетельствует о важной роли, которую 5-HT_{1A} рецепторы играют в развитии и поддержании удивительной природной адаптации – зимней спячки (Naumenko et al., 2008).

Заключение

Накопившиеся данные, в том числе и полученные в лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН, несомненно, свидетельствуют о ключевой роли 5-HT_{1A} рецепторов в ауторегуляции серотониновой системы мозга и об их участии в генетической регуляции различных форм нормального и патологического поведения. Спектр видов поведения, контролируемых 5-HT_{1A} рецепторами, поразительно широк: от эволюционно сложившихся природной адаптации к зимней спячке и доместикиции млекопитающих до таких распространенных психопатологий, как тревожность и депрессия.

Особо интересен тот факт, что селективные агонисты 5-HT_{1A} рецептора приводят к снижению выраженности всех описанных форм поведения. В связи с этим можно предположить, что 5-HT_{1A} рецепторы играют ингибирующую роль в регуляции этих форм поведения. Данные о повышенной активности и плотности 5-HT_{1A} рецепторов и экспрессии кодирующего их гена, полученные на крысах-пасюках, селекционированных на отсутствие агрессивной реакции по отношению к человеку, подтверждают это предположение.

Как уже было отмечено, 5-HT_{1A} рецепторы локализуются как пре-, так и постсинаптически, и в зависимости от своей локализации при активации оказывают различные эффекты на состояние серотониновой системы. Уникальна и система регуляции активности гена 5-HT_{1A} рецептора. В промоторе гена присутствует специфический сай-

ленсер (Ou et al., 2000), отсутствие которого повышает экспрессию гена 5-HT_{1A} рецепторов в 10 раз. Ингибирующий контроль транскрипции гена 5-HT_{1A} рецептора осуществляется также кортикостероидами (Wissink et al., 2000). Белковая структура рецептора позволяет предположить несколько способов посттрансляционной регуляции 5-HT_{1A} рецепторов. Это фосфорилирование протеинкиназой С (Raymond, 1991) и связывание с кальмодулином, понижающие чувствительность рецепторов. Полученные за последнее время данные выявили новый механизм ауторегуляции серотониновой системы мозга, связанный с олигомеризацией 5-HT_{1A} рецептора и его взаимодействием с другими видами 5-HT рецепторов. Оказалось, что ключевой регулятор этой медиаторной системы, 5-HT_{1A} рецептор, сам зависит от серотониновых 5-HT₇ рецепторов, которые, образуя с ним димерные комплексы, ведут к интернализации и функциональной инактивации 5-HT_{1A} рецептора. Эти данные позволили по-новому взглянуть не только на роль 5-HT₇ рецептора и его взаимодействия (cross-talk) с 5-HT_{1A} рецептором, но и на проблему механизма депрессии и действия антидепрессантов группы ингибиторов обратного захвата серотонина (Naumenko et al., 2014).

Отсутствие активирующих посттрансляционных механизмов регуляции 5-HT_{1A} рецепторов также свидетельствует о высокой базальной активности гена рецептора и функциональной активности рецептора, что подтверждает значимость этого рецептора в регуляции поведения.

На основе литературных данных и данных, полученных усилиями сотрудников лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН, можно сделать вывод, что основная регуляция 5-HT_{1A} рецептора осуществляется на посттрансляционном уровне и является ингибирующей. Это объясняет частое несоответствие выраженности экспрессии гена и плотности и чувствительности рецепторов. Транскрипционная регуляция, вероятно, осуществляется только в крайних случаях отклонения поведения от нормы, когда посттрансляционных изменений недостаточно. Об этом свидетельствуют данные о сниженной экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора при депрессивных расстройствах и длительной селекции на агрессивное поведение (Porova et al., 2005). В связи с этим представляются перспективными дальнейшие исследования посттрансляционной регуляции 5-HT_{1A} рецепторов для более глубокого понимания роли этих рецепторов в механизмах регуляции поведения.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Scientific Foundation, project 14-25-00038.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abe M., Nakai H., Tabata R., Saito K., Egawa M. Effect of 5-[3-(((2S)-1,4-benzodioxan-2-ylmethyl)amino)propoxy]-1,3-benzodioxole HCl (MKC-242), a novel 5-HT_{1A}-receptor agonist, on aggressive behavior and marble burying behavior in mice. Jpn. J. Pharmacol. 1998;76(3):297-304.

- Aghajanian G. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Eds F.R. Bloom, D.J. Kupfer. N.Y.: Raven Press, 1995;1451-1459.
- Albert P.R., Lemonde S. 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist*. 2004;10(6):575-593.
- Albert P.R., Sajedi N., Lemonde S., Ghahremani M.H. Constitutive G(i2)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT_{1A} receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists. *J. Biol. Chem.* 1999;274(50):35469-35474.
- Albert P.R., Zhou Q.Y., Van Tol H.H., Bunzow J.R., Civelli O. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *J. Biol. Chem.* 1990;265(10):5825-5832.
- Amir S., Brown Z.W., Amit Z., Ornstein K. Body pinch induces long lasting cataleptic like immobility in mice: behavioral characterization and the effect of naloxone. *Life Sci.* 1981;28(10):1189-1194.
- Barnes N.M., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999;38(8):1083-1152.
- Barykina N.N., Chepkasov I.L., Alehina T.A., Kolpakov V.G. Selection of Wistar rats for the predisposition to catalepsy. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1983;19:2014-2021.
- Belyaev D.K. The Wilhelmine E. Key 1978 invitational lecture. Destabilizing selection as a factor in domestication. *J. Hered.* 1979;70(5):301-308.
- Belyaev D.K., Borodin P.M. Vliyanie stressa na nasledstvennuju izmenchivost i ego rol v jevoljucii [The Effect of Stress on the Hereditary Variability and its Role in the Evolution]. Leningrad, LGU, 1982:35-59.
- Blanchard D.C., Herbert M., Blanchard R.J. Continuity versus (Political) Correctness: Animal Models and Human Aggression. *Animal Models of Human Emotion and Cognition*. (Eds M. Haug, R.E. Whalen, D.C. Washington). American Psychological Association, 1999;297-316.
- Blier P., Ward N.M. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol. Psychiatry*. 2003;53(3):193-203.
- Boutrel B., Monaca C., Hen R., Hamon M., Adrien J. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT_{1A} knock-out mice. *J. Neurosci.* 2002;22(11):4686-4692.
- Broekkamp C.L., Oosterloo S.K., Berendsen H.H., van Delft A.M. Effect of metergoline, fenfluramine, and 8-OHDPAT on catalepsy induced by haloperidol or morphine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1988;338(2):191-195.
- Brunner H.G., Nelen M., Breakefield X.O., Ropers H.H., van Oost B.A. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*. 1993;262(5133):578-580.
- Cases O., Seif I., Grimsby J., Gaspar P., Chen K., Pournin S., Muller U., Aguet M., Babinet C., Shih J.C., De Maeyer E. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*. 1995;268(5218):1763-1766.
- Charest A., Wainer B.H., Albert P.R. Cloning and differentiation-induced expression of a murine serotonin_{1A} receptor in a septal cell line. *J. Neurosci.* 1993;13(12):5164-5171.
- Clotfelter E.D., O'Hare E.P., McNitt M.M., Carpenter R.E., Summers C.H. Serotonin decreases aggression via 5-HT_{1A} receptors in the fighting fish *Betta splendens*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007;87(2):222-231.
- Creti P., Capasso A., Grasso M., Parisi E. Identification of a 5-HT_{1A} receptor positively coupled to planarian adenylyl cyclase. *Cell Biol. Int. Rep.* 1992;16(5):427-432.
- D'Eath R.B., Ormandy E., Lawrence A.B., Sumner B.E., Meddle S.L. Resident-intruder trait aggression is associated with differences in lysine vasopressin and serotonin receptor 1A (5-HT_{1A}) mRNA expression in the brain of pre-pubertal female domestic pigs (*Sus scrofa*). *J. Neuroendocrinol.* 2005;17(10):679-686.
- Dacks A.M., Dacks J.B., Christensen T.A., Nighorn A.J. The cloning of one putative octopamine receptor and two putative serotonin receptors from the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2006;36(9):741-747.
- De Boer S.F., Lesourd M., Mocaer E., Koolhaas J.M. Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors: A comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltopazine, and WAY-100635. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;288(3):1125-1133.
- De Boer S.F., Lesourd M., Mocaer E., Koolhaas J.M. Somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors mediate the anti-aggressive actions of 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: an ethopharmacological study with S-15535, alnespirone, and WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*. 2000;23(1):20-33.
- De Vry J. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1995;121(1):1-26.
- Deng D.R., Djalali S., Holtje M., Grosse G., Stroh T., Voigt I., Kuserow H., Theuring F., Ahnert-Hilger G., Hortnagl H. Embryonic and postnatal development of the serotonergic raphe system and its target regions in 5-HT_{1A} receptor deletion or overexpressing mouse mutants. *Neuroscience*. 2007;147(2):388-402.
- Dixon A.K. Ethological strategies for defence in animals and humans: their role in some psychiatric disorders. *Br. J. Med. Psychol.* 1998;71(Pt 4):417-445.
- Drevets W.C., Thase M.E., Moses-Kolko E.L., Price J., Frank E., Kupfer D.J., Mathis C. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl. Med. Biol.* 2007;34(7):865-877.
- Edwards D.H., Kravitz E.A. Serotonin, social status and aggression. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1997;7(6):812-819.
- Estrada-Camarena E., Fernandez-Guasti A., Lopez-Rubalcava C. Participation of the 5-HT_{1A} receptor in the antidepressant-like effect of estrogens in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(2):247-255.
- Evrard A., Malagie I., Laporte A.M., Boni C., Hanoun N., Trillat A.C., Seif I., De Maeyer E., Gardier A., Hamon M., Adrien J. Altered regulation of the 5-HT system in the brain of MAO-A knock-out mice. *Eur. J. Neurosci.* 2002;15(5):841-851.
- Fargin A., Raymond J.R., Lohse M.J., Kobilka B.K., Caron M.G., Lefkowitz R.J. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature*. 1988;335(6188):358-360.
- Fricchione G.L. Neuroleptic catatonia and its relationship to psychogenic catatonia. *Biol. Psychiatry*. 1985;20(3):304-313.
- Fuller R.W. Role of serotonin in therapy of depression and related disorders. *J. Clin. Psychiatry*. 1991;52(Suppl):52-57.
- Gerhardt C.C., van Heerikhuizen H. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1997;334(1):1-23.
- Goodwin G.M., De Souza R.J., Green A.R., Heal D.J. The pharmacology of the behavioural and hypothermic responses of rats to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Psychopharmacology (Berl.)*. 1987;91(4):506-511.
- Haleem D.J., Shireen E., Haleem M.A. Somatodendritic and postsynaptic serotonin-1A receptors in the attenuation of haloperidol-induced catalepsy. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2004;28(8):1323-1329.
- Hammer R.P., Jr., Hori K.M., Blanchard R.J., Blanchard D.C. Domestication alters 5-HT_{1A} receptor binding in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1992;42(1):25-28.
- Handley S.L. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol. Ther.* 1995;66(1):103-148.
- Hansenne M., Pitchot W., Pinto E., Reggers J., Scantamburlo G., Fuchs S., Pirard S., Ansseau M. 5-HT_{1A} dysfunction in borderline personality disorder. *Psychol. Med.* 2002;32(5):935-941.

- Hassanain M., Bhatt S., Siegel A. Differential modulation of feline defensive rage behavior in the medial hypothalamus by 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors. *Brain Res.* 2003;981(1-2):201-209.
- Heisler L.K., Chu H.M., Brennan T.J., Danao J.A., Bajwa P., Parsons L.H., Tecott L.H. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998;95(25):15049-15054.
- Hill R.H., Svensson E., Dewael Y., Grillner S. 5-HT inhibits N-type but not L-type Ca(2+) channels via 5-HT_{1A} receptors in lamprey spinal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2003;18(11):2919-2924.
- Hirvonen J., Karlsson H., Kajander J., Lepola A., Markkula J., Rasi-Hakala H., Nagren K., Salminen J.K., Hietala J. Decreased brain serotonin 5-HT_{1A} receptor availability in medication-naïve patients with major depressive disorder: an in-vivo imaging study using PET and [carbonyl-11C]WAY-100635. *Int. J. Neuropsychopharmacology.* 2008;11(4):465-476.
- Hjorth S. Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT. *J. Neural. Transm.* 1985;61(1-2):131-135.
- Hsiung S.C., Adlersberg M., Arango V., Mann J.J., Tamir H., Liu K.P. Attenuated 5-HT_{1A} receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase. *J. Neurochem.* 2003;87(1):182-194.
- Humphrey P.P., Barnard E.A. International Union of Pharmacology. XIX. The IUPHAR receptor code: a proposal for an alphanumeric classification system. *Pharmacol. Rev.* 1998;50(2):271-277.
- Humphrey P.P., Hartig P., Hoyer D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993;14(6):233-236.
- Kaufman J., Sullivan G.M., Yang J., Ogden R.T., Miller J.M., Oquendo M.A., Mann J.J., Parsey R.V., DeLorenzo C. Quantification of the serotonin 1A receptor using PET: identification of a potential biomarker of major depression in males. *Neuropsychopharmacology.* 2015;40(7):1692-1699.
- Kobe F., Guseva D., Jensen T.P., Wirth A., Renner U., Hess D., Muller M., Medrihan L., Zhang W., Zhang M., Braun K., Westerholz S., Herzog A., Radyushkin K., El-Kordi A., Ehrenreich H., Richter D.W., Rusakov D.A., Ponomashev E. 5-HT_{7R}/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *J. Neurosci.* 2012;32(9):2915-2930.
- Kobilka B.K., Frielle T., Collins S., Yang-Feng T., Kobilka T.S., Francke U., Lefkowitz R.J., Caron M.G. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature.* 1987;329(6134):75-79.
- Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Popova N.K. Selective breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit76 alleles linked to the 5-HT serotonin receptor gene in mice. *Genes Brain Behav.* 2006;5(8):596-601.
- Korte S.M., Meijer O.C., de Kloet E.R., Buwalda B., Keijser J., Sluyter F., van Oortmerssen G., Bohus B. Enhanced 5-HT_{1A} receptor expression in forebrain regions of aggressive house mice. *Brain Res.* 1996;736(1-2):338-343.
- Kulikov A.V., Bazovkina D.V. Testing linkage hypotheses in hybrid analysis of alternatively distributed behavioral traits with incomplete penetrance. *Genetika=Genetics (Moscow).* 2003;39(8):1066-1072.
- Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Moisan M-P., Mormede P. The mapping of the gene of susceptibility to catalepsy in mice using polymorphic microsatellite markers. *Dokl. Biol. Sci.* 2003;393:531-534.
- Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Moisan M-P., Mormede P. The mapping of the gene of susceptibility to catalepsy in mice using polymorphic microsatellite markers. *Doklady Akademii nauk=Proceedings of the Russian Academy of Sciences.* 2003;393(1):134-137.
- Lai M.K., Tsang S.W., Francis P.T., Esiri M.M., Keene J., Hope T., Chen C.P. Reduced serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the temporal cortex correlates with aggressive behavior in Alzheimer disease. *Brain Res.* 2003;974(1-2):82-87.
- Lanzenberger R.R., Mitterhauser M., Spindelegger C., Wadsak W., Klein N., Mien L.K., Holik A., Attarbaschi T., Mossaheb N., Sacher J., Geiss-Granadia T., Kletter K., Kasper S., Tauscher J. Reduced serotonin-1A receptor binding in social anxiety disorder. *Biol. Psychiatry.* 2007;61(9):1081-1089.
- Lemond S., Du L., Bakish D., Hrdina P., Albert P.R. Association of the C(-1019)G 5-HT_{1A} functional promoter polymorphism with antidepressant response. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2004;7(4):501-506.
- Lemond S., Turecki G., Bakish D., Du L., Hrdina P.D., Bown C.D., Sequeira A., Kushwaha N., Morris S.J., Basak A., Ou X.M., Albert P.R. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J. Neurosci.* 2003;23(25):8788-8799.
- Lopez J.F., Chalmers D.T., Little K.Y., Watson S.J. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol. Psychiatry.* 1998;43(8):547-573.
- Maurel J.L., Autin J.M., Funes P., Newman-Tancredi A., Colpaert F., Vacher B. High-efficacy 5-HT_{1A} agonists for antidepressant treatment: a renewed opportunity. *J. Med. Chem.* 2007;50(20):5024-5033.
- Maxson A.C. Aggression: concepts and methods relevant to genetic analyses in mice and humans. *Neurobehavioral genetics. Methods and applications.* (Eds B.C. Jones, P. Mormede). N.W., Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, 1999;293-300.
- Mendoza D.L., Bravo H.A., Swanson H.H. Antiaggressive and anxiolytic effects of gepirone in mice, and their attenuation by WAY 100635. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999;62(3):499-509.
- Miyata S., Shimoi T., Hirano S., Yamada N., Hata Y., Yoshikawa N., Ohsawa M., Kamei J. Effects of serotonergic anxiolytics on the freezing behavior in the elevated open-platform test in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2007;105(3):272-278.
- Monti J.M., Jantos H. Effects of the 5-HT_{1A} receptor ligands flesinoxan and WAY 100635 given systemically or microinjected into the laterodorsal tegmental nucleus on REM sleep in the rat. *Behav. Brain Res.* 2004;151(1-2):159-166.
- Moyer K.B. Kinds of aggression and their physiological basis. *Commun. Behav. Biol.* 1968;2:65-87.
- Naumenko V.S., Ivanova E.A., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of monoamine oxidase A knockout on the expression of 5-HT_{1A} receptors. *Dokl. Biol. Sci.* 2005;402:205-207.
- Naumenko V.S., Ivanova E.A., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of monoamine oxidase A knockout on the expression of 5-HT_{1A} receptors. *Doklady Akademii nauk=Proceedings of the Russian Academy of Sciences.* 2005;402(2):282-285.
- Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of selection for a high predisposition to catalepsy on the functional activity of 5-HT_{1A} receptors and expression of their gene. *Dokl. Biol. Sci.* 2006;409:299-301.
- Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of selection for high predisposition to catalepsy on the functional activity of 5-HT_{1A} receptors and expression of their gene. *Doklady Akademii nauk=Proceedings of the Russian Academy of Sciences.* 2006;409:133-135.
- Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Popova N.K. Central 5-HT₃ receptor-induced hypothermia in mice: interstrain differences and comparison with hypothermia mediated via 5-HT_{1A} receptor. *Neurosci. Lett.* 2009;465(1):50-54.
- Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Popova N.K. On the role of brain 5-HT₇ receptor in the mechanism of hypothermia: comparison with hypothermia mediated via 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptor. *Neuropharmacology.* 2011;61(8):1360-1365.
- Naumenko V.S., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.F., Kulikov A.V., Popova N.K. Serotonin 5-HT_{1A} receptor in infancy-onset aggression: comparison with genetically defined aggression in adult rats. *Behav. Brain. Res.* 2013;243:97-101.
- Naumenko V.S., Popova N.K., Lacivita E., Leopoldo M., Ponomashev E.G. Interplay between serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in depressive disorders. *CNS Neurosci. Ther.* 2014;20(7):582-590.

- Naumenko V.S., Tkachev S.E., Kulikov A.V., Semenova T.P., Amerhanov Z.G., Smirnova N.P., Popova N.K. The brain 5-HT_{1A} receptor gene expression in hibernation. *Genes. Brain. Behav.* 2008;7(3): 300-305.
- Nikulina E.M., Borodin P.M., Popova N.K. Change in certain forms of aggressive behavior and the concentration of monoamines in the brain during selection of wild rats for taming. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I.P. Pavlova*=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 1985a;35(4):703-709.
- Nikulina E.M., Trapezov O.V., Popova N.K. Concentration of monoamines in the brain of minks differing in their reaction to man. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I.P. Pavlova*=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 1985b;35(6):1142-1146.
- Oakey R.J., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Seldin M.F. Genomic organization of adrenergic and serotonin receptors in the mouse: linkage mapping of sequence-related genes provides a method for examining mammalian chromosome evolution. *Genomics.* 1991;10(2): 338-344.
- Olivier B., Mos J., van Oorschot R., Hen R. Serotonin receptors and animal models of aggressive behavior. *Pharmacopsychiatry.* 1995;28(Suppl. 2):80-90.
- Ou X.M., Jafar-Nejad H., Storrer J.M., Meng J.H., Lemonde S., Albert P.R. Novel dual repressor elements for neuronal cell-specific transcription of the rat 5-HT_{1A} receptor gene. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(11):8161-8168.
- Ou X.M., Storrer J.M., Kushwaha N., Albert P.R. Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT_{1A} receptor gene. *J. Biol. Chem.* 2001;276(17):14299-14307.
- Overstreet D.H., Commissaris R.C., De La Garza R., 2nd, File S.E., Knapp D.J., Seiden L.S. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. *Stress.* 2003;6(2):101-110.
- Parks C.L., Robinson P.S., Sibille E., Shenk T., Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin 1A receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998;95(18):10734-10739.
- Peroutka S.J., Howell T.A. The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology.* 1994;33(3-4):319-324.
- Plyusnina I., Oskina I. 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., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K. Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human. *Behav. Genet.* 2009;39(2):202-212.
- Popa D., El Yacoubi M., Vaugeois J.M., Hamon M., Adrien J. Homeostatic regulation of sleep in a genetic model of depression in the mouse: effects of muscarinic and 5-HT_{1A} receptor activation. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(8):1637-1646.
- Popova N.K. Serotonin in genetically determined types of defensive behavior. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova.* 1997;47(2): 350-357.
- Popova N.K. Serotonin in genetically determined types of defensive behavior. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I.P. Pavlova*=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 1997;47:93-97.
- Popova N. Brain serotonin in genetically defined defensive behaviour. *Complex Brain Functions: Conceptual Advances in Russian Neuroscience.* (Eds R. Millar, A. Ivaniitsky, P. Balaban). London: Harwood Press, 1999;307-329.
- Popova N.K. The role of brain serotonin in the expression of genetically determined defensive behavior. *Genetika*=Genetics (Moscow). 2004;40(6):770-778.
- Popova N.K., Avgustinovich D.F., Kolpakov V.G., Plyusnina I.Z. Specific [3H]8-OH-DPAT binding in brain regions of rats genetically predisposed to various defense behavior strategies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998;59(4):793-797.
- Popova N.K., Gilinsky M.A., Amstislavskaya T.G., Morosova E.A., Seif I., De Maeyer E. Regional serotonin metabolism in the brain of transgenic mice lacking monoamine oxidase A. *J. Neurosci. Res.* 2001;66(3):423-427.
- Popova N.K., Kulikov A.V., Nikulina E.M., Kozlachkova E.Y., Maslova G.B. Serotonin metabolism and serotonergic receptors in Norway rats selected for low aggressiveness to man. *Aggressive Behav.* 1991a;17:207-213.
- Popova N.K., Naumenko V.S. Polymorphism in 5-HT receptors as the background of serotonin functional diversity. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*=Russian Journal of Physiology. 2010;96(8):778-786.
- Popova N.K., Naumenko V.S. 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Rev. Neurosci.* 2013;24(2):191-204.
- Popova N.K., Naumenko E.V., Kolpakov V.G. Serotonin i povedenie [Serotonin and Behavior]. Novosibirsk, Nauka, 1978.
- Popova N.K., Naumenko V.S., Plyusnina I.Z., Kulikov A.V. Reduction in 5-HT_{1A} receptor density, 5-HT_{1A} mRNA expression, and functional correlates for 5-HT_{1A} receptors in genetically defined aggressive rats. *J. Neurosci. Res.* 2005;80(2):286-292.
- Popova N.K., Voitenko N.N., Kulikov A.V., Avgustinovich D.F. Evidence for the involvement of central serotonin in mechanism of domestication of silver foxes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991b; 40(4):751-756.
- Pruus K., Skrebuhhova-Malmros T., Rudissaar R., Matto V., Allikmets L. 5-HT_{1A} receptor agonists buspirone and gepirone attenuate apomorphine-induced aggressive behaviour in adult male Wistar rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2000;51(4 Pt 2):833-846.
- Rakel R.E. Long-term buspirone therapy for chronic anxiety: a multicenter international study to determine safety. *South Med. J.* 1990; 83(2):194-198.
- Ramboz S., Oosting R., Amara D.A., Kung H.F., Blier P., Mendelsohn M., Mann J.J., Brunner D., Hen R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998;95(24):14476-14481.
- Raymond J.R. Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT_{1A} receptor. *J. Biol. Chem.* 1991;266(22): 14747-14753.
- Renner U., Zeug A., Woehler A., Niebert M., Dityatev A., Dityateva G., Gorinski N., Guseva D., Abdel-Galil D., Frohlich M., Doring F., Wischmeyer E., Richter D.W., Neher E., Ponimaskin E.G. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J. Cell. Sci.* 2012;125(Pt 10):2486-2499.
- Ricci L.A., Rasakham K., Grimes J.M., Melloni R.H., Jr. Serotonin-1A receptor activity and expression modulate adolescent anabolic/androgenic steroid-induced aggression in hamsters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006;85(1):1-11.
- Robinson D.S., Alms D.R., Shrotriya R.C., Messina M., Wickramaratne P. Serotonergic anxiolytics and treatment of depression. *Psychopathology.* 1989;22(Suppl. 1):27-36.
- Sanberg P.R., Bunsey M.D., Giordano M., Norman A.B. The catalepsy test: its ups and downs. *Behav. Neurosci.* 1988;102(5):748-759.
- Saudou F., Hen R. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular and functional diversity. *Adv. Pharmacol.* 1994;30:327-380.
- Sawiniec J., Borkowski K., Ginalska G., Lewandowska-Stanek H. Association between 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism and suicidal behavior. *Przegl. Lek.* 2007;64(4-5):208-211.
- Serretti A., Artioli P., De Ronchi D. The 5-HT_{2C} receptor as a target for mood disorders. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2004;8(1):15-23.
- Shively C.A., Friedman D.P., Gage H.D., Bounds M.C., Brown-Proctor C., Blair J.B., Henderson J.A., Smith M.A., Buchheimer N. Behavioral depression and positron emission tomography-determined serotonin 1A receptor binding potential in cynomolgus monkeys. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2006;63(4):396-403.
- Sibille E., Arango V., Galfalvy H.C., Pavlidis P., Erraji-Benchekroun L., Ellis S.P., John Mann J. Gene expression profiling of depression and

- suicide in human prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(2):351-361.
- Singerman B., Raheja R. Malignant catatonia-a continuing reality. *Ann. Clin. Psychiatry*. 1994;6(4):259-266.
- Sperry T.S., Thompson C.K., Wingfield J.C. Effects of acute treatment with 8-OH-DPAT and fluoxetine on aggressive behaviour in male song sparrows (*Melospiza melodia morphna*). *J. Neuroendocrinol*. 2003;15(2):150-160.
- Stein D.J., Miczek K.A., Lucion A.B., de Almeida R.M. Aggression-reducing effects of F15599, a novel selective 5-HT_{1A} receptor agonist, after microinjection into the ventral orbital prefrontal cortex, but not in infralimbic cortex in male mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2013;230(3):375-387.
- Storring J.M., Charest A., Cheng P., Albert P.R. TATA-driven transcriptional initiation and regulation of the rat serotonin 5-HT_{1A} receptor gene. *J. Neurochem*. 1999;72(6):2238-2247.
- Sun Y.N., Wang T., Wang Y., Han L.N., Li L.B., Zhang Y.M., Liu J. Activation of 5-HT_{1A} receptors in the medial subdivision of the central nucleus of the amygdala produces anxiolytic effects in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2015;95:181-191.
- Trut L.N. Nekotorye novye dannye po selekcii serebristo-chernyh lisic (*Vulpes fulvus* Desm.) po svojstvam ih oboronitelnogo povedenija. [Some New Data on Selection of Silver Foxes (*Vulpes fulvus* Desm.) with Regard to Features of Their Defensive Behavior]. *Genetika povedenija [The Genetics of Behavior]*. Leningrad, Nauka, 1969.
- Trut L.N. Ocherki po genetike povedenija [Essays on Behavioral Genetics]. Novosibirsk, Nauka, 1978.
- Turner J.H., Gelasco A.K., Raymond J.R. Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem*. 2004;279(17):17027-17037.
- van den Berg L., Kwant L., Hestand M.S., van Oost B.A., Leegwater P.A. Structure and variation of three canine genes involved in serotonin binding and transport: the serotonin receptor 1A gene (*htr1A*), serotonin receptor 2A gene (*htr2A*), and serotonin transporter gene (*slc6A4*). *J. Hered*. 2005;96(7):786-796.
- Woehler A., Wlodarczyk J., Ponomaskin E.G. Specific oligomerization of the 5-HT_{1A} receptor in the plasma membrane. *Glycoconj J*. 2009;26(6):749-756.
- Wissink S., Meijer O., Pearce D., van Der Burg B., van Der Saag P.T. Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids. *J. Biol. Chem*. 2000;275(2):1321-1326.
- Zhang Y., D'Souza D., Raap D.K., Garcia F., Battaglia G., Muma N.A., Van de Kar L.D. Characterization of the functional heterologous desensitization of hypothalamic 5-HT(1A) receptors after 5-HT(2A) receptor activation. *J. Neurosci*. 2001;21(20):7919-7927.
- Zhuang X., Gross C., Santarelli L., Compan V., Trillat A.C., Hen R. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21(2 Suppl):52S-60S.
- Zifa E., Fillion G. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol. Rev*. 1992;44(3):401-458.



Влияние раннего провоспалительного стресса на экспрессию различных транскриптов *BDNF* в отделах мозга самцов крыс препубертатного возраста

Д.И. Перегуд^{1, 2}✉, С.В. Фрейман^{2, 3}, А.О. Тишкина², Л.С. Сохраняева², Н.А. Лазарева², М.В. Онуфриев^{2, 3}, М.Ю. Степаничев², Н.В. Гуляева²

¹ Научно-исследовательский институт наркологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

³ Научно-практический центр психоневрологии департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия

Провоспалительный стресс, перенесенный в раннем постнатальном периоде, способен провоцировать нарушение различных типов поведения у взрослых половозрелых особей, при этом механизмы, лежащие в основе данных нарушений, изучены недостаточно. Мозговой нейротрофический фактор (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) играет ключевую роль в реализации нейропластических процессов как в норме, так и при патологии. Ген *BDNF* транскрибируется в виде экзон-специфических мРНК, которые могут обладать различной реактивностью в зависимости от стимула. Мы предположили, что нарушения экспрессии специфических мРНК *BDNF* в отделах центральной нервной системы после стресса, вызванного провоспалительными стимулами на ранних этапах онтогенеза, могут составлять один из механизмов последующих расстройств поведения. Целью работы явилось исследование влияния провоспалительного стресса в раннем неонатальном периоде на содержание BDNF на уровне полипептида и паттерн экспрессии экзон-специфических мРНК *BDNF* в неокортексе и гиппокампе самцов крыс препубертатного возраста. Провоспалительный стресс вызывали путем подкожного введения бактериального липополисахарида детенышам крыс на третий и пятый постнатальные дни, а анализ BDNF проводили в возрасте 36 дней. Концентрацию полипептида BDNF в отделах головного мозга оценивали посредством твердофазного иммуноферментного анализа, экспрессию экзон-специфических мРНК *BDNF* исследовали с помощью количественной полимеразной цепной реакции после этапа обратной транскрипции. Содержание полипептида BDNF и уровень транскриптов, содержащих общий экзон IX, не менялись в результате провоспалительного стресса. В неокортексе (но не в гиппокампе) крыс, которым вводили липополисахарид, снижался уровень мРНК *BDNF*, содержащей экзон IV. Изменений в уровне других транскриптов, содержащих экзоны I и VI, не наблюдалось ни в одном из исследованных отделов мозга. Учитывая, что, согласно данным литературы, у животных, перенесших ранний провоспалительный стресс, развиваются нарушения поведения, мы предполагаем, что специфические изменения паттерна экспрессии *BDNF* могут быть вовлечены в патогенез этих нарушений.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор; транскрипция *BDNF*; ранний провоспалительный стресс; липополисахарид; неокортекс; гиппокамп.

Effects of early neonatal proinflammatory stress on the expression of *BDNF* transcripts in the brain regions of prepubertal male rats

D.I. Peregud^{1, 2}✉, S.V. Freiman^{2, 3}, A.O. Tishkina², L.S. Sokhranyeva², N.A. Lazareva², M.V. Onufriev^{2, 3}, M.Y. Stepanichev², N.V. Gulyaeva²

¹ Federal State Budgetary Institution "V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Drug Addiction", of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Research and Practice Psychoneurology Centre, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

Early postnatal proinflammatory stress provokes behavioral impairments in adulthood; however, underlying mechanisms are still elusive. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a crucial role in neuroplastic changes in health as well as at pathology. The *BDNF* gene is transcribed to exon-specific mRNAs and the pattern of their expression depends on stimulus. We suggest that disturbances of exon-specific *BDNF* mRNA expression in the brain regions after stress induced by proinflammatory stimuli in early postnatal period could be one of the underlying mechanisms of consequent behavioral impairments. Thus, the aim of the study was to investigate the effects of proinflammatory stress in early postnatal ontogeny on the expression of BDNF and the patterns of expression of the *BDNF* gene in the neocortex and hippocampus of prepubertal male rats. The proinflammatory stress was induced by subcutaneous administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS) to rat pups on postnatal days 3 and 5, while BDNF expression was analyzed in 36-day-old rats. BDNF polypeptide concentration was estimated by means of an enzyme-linked immunosorbent assay, while quantitative polymerase chain reaction followed by reverse transcription was used to detect exon-specific *BDNF* mRNA expression. The levels of BDNF and transcripts, containing common exon IX were similar

in the control and LPS-treated rats. In the rats treated with LPS, the level of *BDNF* mRNA, containing exon IV, was lower in the neocortex, but not in the hippocampus. No changes in the expression of the transcripts containing exons I and VI were observed in any brain structure studied. We suggest that specific alterations in *BDNF* expression may be involved in the susceptibility to the development of behavioral impairments of animals subjected to early proinflammatory stress.

Key words: brain-derived neurotrophic factor; *BDNF* transcription; early proinflammatory stress; lipopolysaccharide; neocortex; hippocampus.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Перегуд Д.И., Фрейман С.В., Тишкина А.О., Сохраняева Л.С., Лазарева Н.А., Онуфриев М.В., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В. Влияние раннего провоспалительного стресса на экспрессию различных транскриптов *BDNF* в отделах мозга самцов крыс препубертатного возраста. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):191-197. DOI 10.18699/VJ16.149

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Peregud D.I., Freiman S.V., Tishkina A.O., Sokhranyeva L.S., Lazareva N.A., Onufriev M.V., Stepanichev M.Y., Gulyaeva N.V. Effects of early neonatal proinflammatory stress on the expression of *BDNF* transcripts in the brain regions of prepubertal male rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):191-197. DOI 10.18699/VJ16.149

Изменения транскрипционного профиля в различных отделах ЦНС лежат в основе долговременных модификаций нейропластичности (Tabuchi, 2008; Lyons, West, 2011). С помощью экспрессионного анализа на полногеномном уровне установлено, что различные виды стресса (Erburu et al., 2015), включая индуцированный провоспалительными стимулами (Oskvig et al., 2012), могут сопровождаться значимыми изменениями уровня тысяч мРНК в ЦНС. Нарушения нейропластичности, вызванные стрессом, в значительной степени обусловлены изменениями нейротрофического обеспечения клеток мозга. В частности, стресс подавляет экспрессию и содержание в ЦНС мозгового нейротрофического фактора (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF), который играет центральную роль в процессах нейропластичности (Сахарнова и др., 2012; Иванов, 2014; Calabrese et al., 2014). Введение бактериального липополисахарида (ЛПС) грызунам сопровождается снижением экспрессии BDNF в гиппокампе и неокортексе на уровне как полипептида (Guan, Fang, 2006), так и мРНК (Kranjac et al., 2012). По всей видимости, снижение экспрессии BDNF в отделах мозга является одним из ключевых звеньев в реализации поведенческих нарушений, отмечаемых при введении ЛПС. Так, в работе Zhang с коллегами (2014) приведены данные о том, что введение ЛПС приводит к снижению экспрессии BDNF, уровня фосфорилирования его рецептора TrkB, плотности шипиков в гиппокампе и неокортексе, а также к развитию депрессивно-подобного состояния, а стимуляция сигналинга BDNF посредством миметика TrkB 7,8-гидроксифлавона предотвращает указанные нарушения (Zhang et al., 2014). Таким образом, ЛПС модулирует экспрессию BDNF, что, очевидно, имеет функциональное значение, однако происходят ли подобные изменения при воздействии ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе, а также меняются ли транскрипционные механизмы, лежащие в основе данного феномена, остается неизученным.

Транскрипция *BDNF* представляет собой сложно организованный процесс, который определяют структурные особенности гена *BDNF* и комплекс факторов, модулиру-

ющих его транскрипционную регуляцию. К настоящему моменту известно, что мРНК *BDNF* грызунов может быть представлена 18 различными вариантами (Aid et al., 2007). Все они кодируют одинаковую аминокислотную последовательность препробелка BDNF. Большое число вариантов мРНК обусловлено тем, что ген *BDNF* содержит по меньшей мере 9 экзонов (некодирующие экзоны I–VIII, и кодирующий экзон IX, общий для всех транскриптов) (Aid et al., 2007). В 5'-области каждого некодирующего экзона расположены индивидуальные промоторы, с которых иницируется транскрипция. В ЦНС грызунов транскрипты *BDNF*, содержащие экзоны I, IV и VI, наиболее реактивны в отношении разнообразных стимулов. В частности, изменение транскрипционного профиля *BDNF* было отмечено в результате социального стресса (Duclot, Kabbaj, 2013) или обучения в условиях выраженного стрессорного воздействия, например при выработке контекст-зависимой условной реакции страха (Lubin et al., 2008). Известно также, что стресс в форме экспозиции детенышей стрессированной матери в раннем постнатальном онтогенезе приводит к снижению экспрессии *BDNF* в мозге, которое происходит вследствие метилирования промоторного участка экзона IV (Roth et al., 2009).

Следует отметить, что ранний постнатальный онтогенез характеризуется высокой чувствительностью мозга к влиянию средовых факторов. Хорошо известно, что различные воздействия в этот период онтогенеза могут иметь длительные последствия, которые проявляются у взрослых особей в виде предрасположенности к развитию психических нарушений (O'Connor et al., 2005; Loman, Gunnar, 2010). Принято считать, что стрессорные воздействия на организм в критические периоды имеют «программирующее» действие, приводя к необратимым долговременным последствиям (Lucassen et al., 2013). К стрессорным воздействиям подобного рода можно отнести нарушение родительской заботы о потомстве, включая материнскую депрессию (O'Connor et al., 2005), изменения структуры питания (Laus et al., 2011), эмоциональные потрясения (Yehuda et al., 2005). Причиной возникновения

подобных длительных изменений могут быть структурно-функциональные нарушения в ряде отделов мозга, в частности в гиппокампе, созревание которого продолжается в течение длительного времени после рождения (Altman, Bayer, 1990; Arnold, Trojanowski, 1996).

Эффекты «программирующего» воздействия на развитие мозга имеет и стрессорная реакция, возникающая в ответ на проникновение в организм различных патогенов. В частности, парентеральное введение детенышам крыс бактериального ЛПС в раннем постнатальном периоде вызывает развитие выраженной стресс-реакции, которая приводит к значительным перестройкам в ЦНС. Следствием подобного стрессорного воздействия в раннем постнатальном периоде является возникновение существенных нарушений поведения у взрослых половозрелых особей (Walker et al., 2009, 2011, 2012). К наиболее характерным последствиям такого воздействия у грызунов можно отнести нарушения устойчивости к стрессу, проявления тревожности и депрессивно-подобного поведения, снижение исследовательской активности, нарушения процессов нейропластичности, которые лежат в основе обучения и формирования памяти (Walker et al., 2009; Rico et al., 2010; Sominsky et al., 2012a, b; Doosti et al., 2013). Учитывая, что развитие постстрессорной депрессии в значительной степени обусловлено нарушениями в системе нейротрофинов (Григорьян и др., 2014; Stepanichev et al., 2014), в частности BDNF, необходимо изучить, как «программирующее» воздействие стресса в раннем постнатальном онтогенезе изменяет процессы, вовлеченные в продукцию этого нейротрофина в мозге.

Целью работы явилось исследование влияния раннего неонатального введения ЛПС на содержание BDNF и экспрессию экзон-специфических мРНК *BDNF* (I, IV, VI и IX) в гиппокампе и неокортексе крыс.

Методы

Эксперименты с животными выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и приказа № 267 МЗ РФ от 19 июня 2003 г. в области защиты и использования животных в экспериментальных исследованиях. Протокол эксперимента утвержден Этической комиссией ИВНД и НФ РАН.

Беременные самки крыс линии Вистар были получены из Филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Московская область, Россия) и размещены индивидуально в клетках вивария. Животные имели неограниченный доступ к пище и воде, световая фаза суточного цикла продолжалась с 8:00 до 20:00. День рождения детенышей крыс считали днем 0 постнатального периода (ПНД0). После родов число детенышей в помете снижали до девяти. До возраста ПНД21 крысят содержали в клетках вместе с матерями. В возрасте 21 день самцов и самок рассаживали по отдельным клеткам таким образом, чтобы крысята, рожденные в одном помете, находились вместе.

На третий и пятый дни после рождения крысятам подожно вводили бактериальный ЛПС из *Escherichia coli*,

серотип O26:B6 (Sigma, США) в дозе 50 мкг/кг в объеме 200 мкл/кг. ЛПС растворяли непосредственно перед введением в изотоническом (0,9 %) водном растворе NaCl. Контрольные животные получали соответствующий объем изотонического раствора. Такая схема введения и доза ЛПС не приводят к гибели животных и вызывают стресс-ответ, который детектируется в течение 48 ч (Shanks et al., 1995).

Животных декапитировали в возрасте ПНД36 (предпубертатный период) под хлоралгидратной анестезией (350 мг/кг). Мозг вынимали, промывали в ледяном 0,9 %-м растворе NaCl и на льду вынимали гиппокамп и неокортекс. Структуры левого полушария использовали для оценки содержания BDNF, а правого – для анализа профиля экспрессии мРНК *BDNF*. Возможную асимметрию при этом не учитывали, поскольку для BDNF она была отмечена лишь в редких работах, и эти данные являются весьма противоречивыми (Lehmann et al., 2007; Farhang et al., 2014). Выбор указанных регионов мозга был обусловлен тем, что в них отмечают структурно-функциональные перестройки, которые, по-видимому, определяют поведенческие расстройства при стрессе. Кроме того, как обсуждалось выше, эффекты введения ЛПС на нейротрофины в мозге взрослых животных проявляются наиболее ярко в этих отделах.

Содержание BDNF в ткани мозга крыс оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использовали наборы ChemiKine Brain-Derived Neurotrophic Factor Sandwich ELISA kit (#CYT306; Millipore, США). Ткань мозга гомогенизировали в ледяном буфере согласно инструкции производителя. Полученные в результате центрифугирования супернатанты апплицировали в лунки планшета с предварительно адсорбированными первичными антителами к BDNF и далее анализ проводили согласно инструкции производителя. Содержание BDNF выражали в пг/мг массы ткани.

Экспрессию экзон-специфичных вариантов мРНК *BDNF* оценивали посредством проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с регистрацией продуктов амплификации в режиме реального времени после этапа обратной транскрипции. Тотальную РНК из образцов экстрагировали с помощью набора реактивов mirVana (#AM1560; Ambion, США). Чистоту и концентрацию тотальной РНК исследовали посредством измерения оптической плотности при 260 нм и 280 нм. Образцы, для которых отношение оптической плотности 260/280 не входило в диапазон между 1,8 и 2,1, исключали из исследования. Целостность тотальной РНК оценивали посредством электрофореза в 1,5 %-м агарозном геле. Для удаления примесей геномной ДНК изолированная тотальная РНК была обработана DNase I (#M0303; NEB, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов для синтеза комплементарной ДНК Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1642; Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР проводили в двух параллельных образцах в присутствии 5 пмоль синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров с помощью набора реактивов, содержащего Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами, и интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR GREEN

Synthetic oligonucleotides

Template	Nucleotide sequence (5'→3')		Amplicon size, bp
	Forward	Reverse	
<i>BDNF</i> exon I (NM_012513.4)	GCGTTGAGAAAGCTGCTTCAG	GAATGAGCGAGGTTACCAATGA	77
<i>BDNF</i> exon IV (NM_001270633.1)	TTCCACTATCAATAATTTAACTTCTTTGC	CTCTTACTATATATTTCCCTTCTCTTCAGT	114
<i>BDNF</i> exon VI (NM_001270630.1)	TTTGGGGCAGACGAGAAAGC	GGCAGTGGAGTCACATTGTTGTC	81
<i>BDNF</i> exon IX	CCATAAGGACGCGACTTGTAC	AGACATGTTTGCGGCATCCAGG	121
rpS18 (NM_213557.1)	TTTTGGGGCCTTCGTGTCCG	CAGCAAAGGCCAAAGACTCAT	102

(#PK147S; Евроген, Россия). Последовательности праймеров, специфичных для мРНК rpS18 (рибосомальный белок S18 – ген сравнения), были подобраны с помощью сервиса <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Последовательности праймеров для экзон-специфичных мРНК *BDNF* (транскрипты, содержащие экзон I, IV или VI) были взяты из работы Schmidt с коллегами (Schmidt et al., 2012). Для оценки общей транскрипции *BDNF* оценивали уровень мРНК, содержащих экзон IX (этот экзон является общим и его содержат все варианты *BDNF*) с помощью праймеров, описанных ранее (Tsankova et al., 2004). Последовательности синтетических олигонуклеотидов, использованных в работе, представлены в таблице. Олигонуклеотиды были синтезированы компанией Евроген (Россия). ПЦР проводили посредством термоциклера АНК-32 (ИАиП РАН и МГТУ им. Н.Э. Баумана, Россия) по следующей программе: 1) 10 с при 95 °C; 2) 10 с при 65 °C; 3) 40 с при 72 °C. При исследовании количества мРНК rpS18 было проведено 40 циклов амплификации, при исследовании количества экзон-специфичных мРНК *BDNF* – 50 циклов амплификации. Количество специфической мРНК было оценено посредством регистрации порогового цикла (C_t) с помощью программы ANK32 для Windows версия 1.1 (ИАиП РАН, Россия) и последующего сравнительного анализа с использованием содержания мРНК rpS18 в качестве гена сравнения по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Для сравнения данных в экспериментальных группах применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, поскольку в большинстве случаев распределение переменных в выборках не соответствовало нормальному. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Содержание *BDNF* в неокортексе и гиппокампе крыс препубертатного возраста исследовали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Не удалось выявить существенного изменения в содержании *BDNF* ни в неокортексе, ни в гиппокампе у крыс, перенесших раннее провоспалительное воздействие, по сравнению с контрольными животными (рис. 1).

Общий уровень содержания продуктов транскрипции оценивали по количеству мРНК, включающей экзон IX, который является общим для всех вариантов *BDNF*. Как видно из данных, представленных на рис. 2 и 3, ни в неокортексе, ни в гиппокампе крыс препубертатного возраста

общий уровень экспрессии мРНК *BDNF* не различался в подопытной группе по сравнению с контрольной. Эти данные хорошо соотносятся с результатами, полученными с помощью иммуноферментного анализа. Однако в неокортексе (см. рис. 2) наблюдались достоверные изменения в паттерне экспрессии экзон-специфичных вариантов мРНК. В частности, было обнаружено снижение уровня транскриптов, содержащих экзон IV. Содержание других исследованных транскриптов было сходным с таковым у контрольных животных того же возраста. Вопреки ожиданиям, нам не удалось выявить существенных изменений в паттерне экспрессии экзон-специфичных транскриптов мРНК в гиппокампе (рис. 3).

Корреляционный анализ показал, что содержание мРНК экзонов I, IV и VI достоверно положительно коррелирует с уровнем экзона IX в неокортексе (рис. 3, а) независимо от введения ЛПС (рис. 3, б). Тогда как в гиппокампе введение ЛПС нарушало положительные корреляционные отношения экзонов I, VI и, в меньшей степени, IV с эксоном IX (рис. 3, в), которые отмечались у животных контрольной группы (рис. 3, в).

Таким образом, показано, что провоспалительное воздействие бактериальным ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе не вызывает существенного изменения содержания полипептида и мРНК *BDNF* в неокортексе и гиппокампе крыс препубертатного возраста. При этом в неокортексе происходит достоверное снижение уровня транскрипта *BDNF*, содержащего экзон IV, а в гиппокампе наблюдаются нарушения взаимосвязи между экспрессией специфических мРНК.

Обсуждение

Данные литературы указывают на то, что провоспалительные стимулы способны существенно изменять метаболизм *BDNF* в мозге. При этом в гиппокампе и неокортексе наблюдаются изменения на уровне как полипептида (Guan, Fang, 2006; Zhang et al., 2014), так и мРНК (Kranjac et al., 2012). Авторы этих работ отмечали, как правило, снижение уровня как полипептида *BDNF*, так и мРНК *BDNF*. В отличие от этих исследований, в представленной работе изучали **отдаленные** эффекты введения ЛПС в **неонатальный** период развития. У крыс препубертатного возраста нам не удалось обнаружить существенных изменений экспрессии полипептида и общей транскрипционной активности гена *BDNF* ни в неокортексе, ни

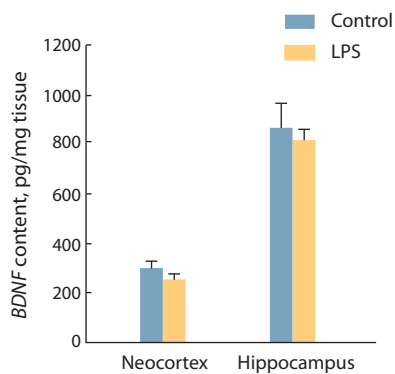


Fig. 1. *BDNF* contents in brain regions of prepubertal male rats after early neonatal proinflammatory stress. The data are presented as $M \pm SEM$. Number of animals per group $N = 10$.

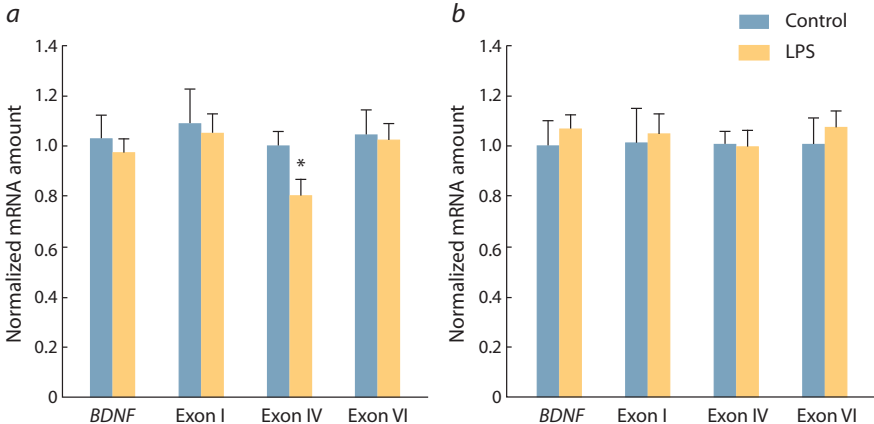


Fig. 2. Expression patterns of *BDNF* exon-specific transcripts in brain divisions of prepubertal male rats after early neonatal proinflammatory stress: (a) neocortex, (b) hippocampus. The data are presented as $M \pm SEM$. Number of animals per group $N = 10$. * Differences from the control group significant at $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test).

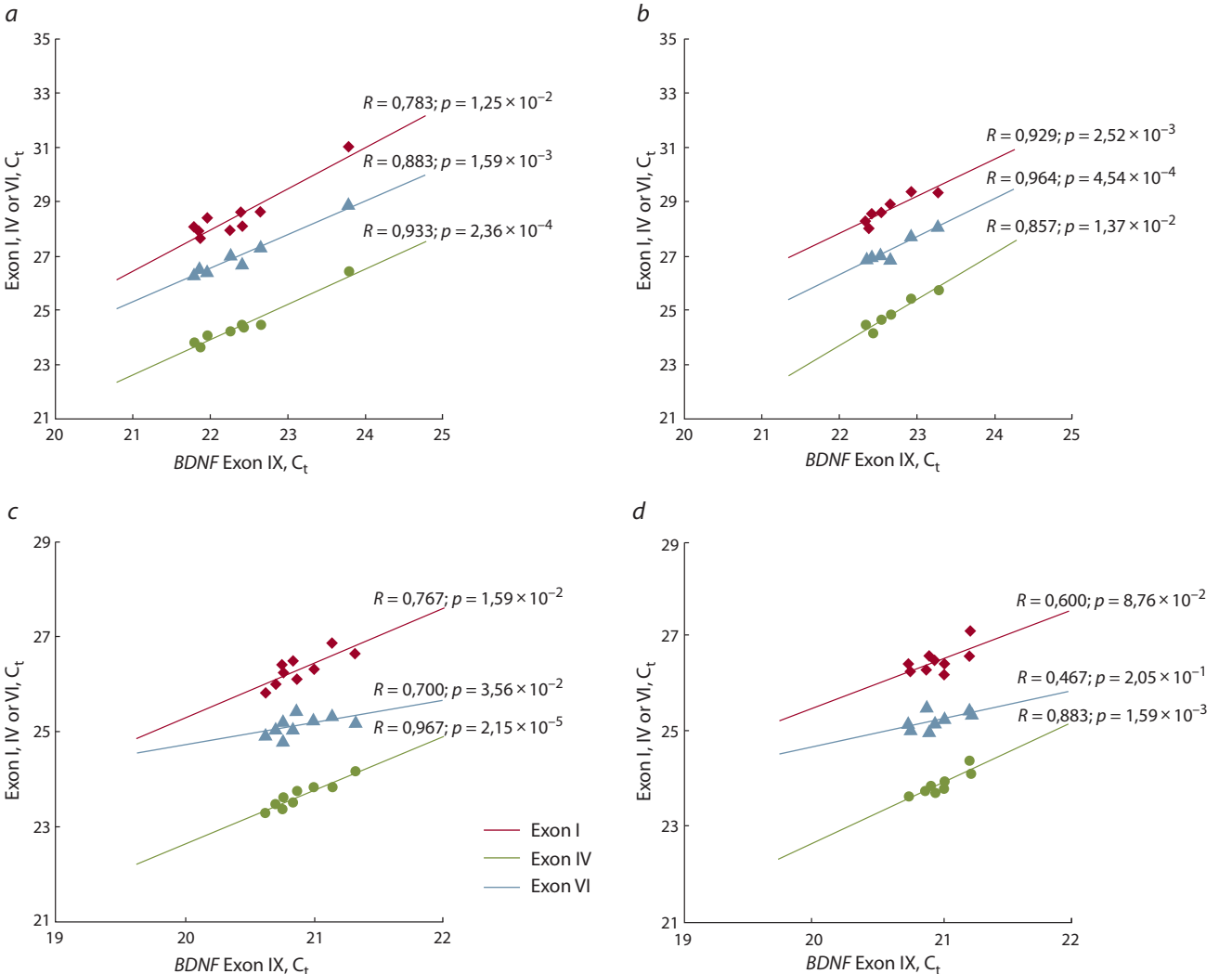


Fig. 3. Co-expression of *BDNF* transcripts containing exons I, IV, VI and the *BDNF* transcript containing the common exon IX. (a) Neocortex, Control group; (b) Neocortex, LPS group; (c) Hippocampus, Control group; (d) Hippocampus, LPS group. Spearman's rank correlation, R , correlation coefficient.

в гиппокампе, и единственным достоверным эффектом экспериментального воздействия стало снижение содержания мРНК *BDNF*, включающей экзон IV, в неокортексе. Учитывая результаты предыдущих работ (Kranjac et al., 2012), в которых было показано снижение уровня мРНК *BDNF* в гиппокампе и неокортексе, можно было ожидать, что наряду со снижением экспрессии транскриптов, содержащих специфические экзоны, будет отмечаться снижение транскриптов, имеющих общий экзон IX. Однако подобного эффекта не наблюдалось. Возможно, дизайн представленного эксперимента (меньшая доза ЛПС и намного более поздний забор ткани) не позволил детектировать выраженные изменения.

Тем не менее результаты настоящего исследования согласуются с проведенными ранее экспериментами, в которых было обнаружено снижение уровня мРНК *BDNF*, содержащей экзон IV, в префронтальной коре после экспозиции крыс с первого по седьмой день после рождения стрессированным самкам (Roth et al., 2009). Авторы указывают, что этот «программирующий» эффект раннего стрессорного воздействия был связан с эпигенетическим влиянием на промотор IV экзона. Сходство этих результатов с нашими может свидетельствовать о том, что природа стрессорного фактора менее важна для регуляции экспрессии *BDNF*, чем факт наличия значимой стресс-реакции, в данном случае возникающей в результате воздействия ЛПС на организм в раннем неонатальном периоде. Несмотря на то, что в нашей работе эффект раннего провоспалительного воздействия не отражался непосредственно в достоверном снижении или увеличении уровней мРНК разных экзонов гена *BDNF* в гиппокампе животных препубертатного возраста, тем не менее, наблюдалось рассогласование коэкспрессии мРНК I, VI и, в меньшей степени, IV экзона с эксоном IX, что может быть следствием нарушения регуляции процесса транскрипции у этих крыс.

Промотор экзона IV гена *BDNF* среди прочих содержит консенсусные сайты связывания транскрипционного фактора NF-κB, которые оказывают положительное влияние на активность промотора (Pruunsild et al., 2011) и экспрессию соответствующей мРНК (Lipsky et al., 2001; Saha et al., 2006). NF-κB является хорошо охарактеризованной нижележащей мишенью рецептора ЛПС TLR4: ЛПС, связываясь со своим рецептором, инициирует цепь внутриклеточных молекулярных событий, приводящих к транслокации NF-κB в ядро и стимуляции транскрипции генов (Kawai, Akira, 2007). Можно предположить, что отдаленным эффектом раннего неонатального введения ЛПС является снижение активности NF-κB и, как следствие, снижение экспрессии мРНК *BDNF*, содержащих экзон IV, который наблюдали в настоящей работе. С другой стороны, мы не можем исключить и упомянутого выше эффекта метилирования этого промотора.

Функциональная значимость сложной транскрипционной организации гена *BDNF* до конца не понятна, но предполагается, что транскрипты, содержащие разные экзоны, могут различаться локализацией внутри нейронов. После деполаризации мРНК *BDNF*, содержащая экзоны II и VI, локализуется преимущественно в дистальных дендритах, а транскрипты, содержащие экзоны I и IV, локализованы

в теле нейронов (Chiaruttini et al., 2008). Более того, снижение уровня мРНК, содержащей определенные экзоны, посредством интерферирующих РНК специфически нарушает архитектуру дендритов в культуре нейронов: экзоны I и IV селективно влияют на проксимальные дендриты, а экзоны II и VI – на дистальные (Baj et al., 2011). По-видимому, особенности локализации мРНК *BDNF* взаимосвязаны с локальным белковым синтезом и лежат в основе пластических изменений.

Таким образом, можно предположить, что специфическое снижение экспрессии мРНК *BDNF*, содержащей экзон IV, в неокортексе может быть вовлечено в патогенез структурно-функциональных нарушений ЦНС при неонатальном введении ЛПС и, соответственно, в формирование предрасположенности животных, перенесших ранний провоспалительный стресс, к развитию нарушений поведения.

Acknowledgments

The authors are grateful to Natalia Stepanicheva for excellent technical assistance in handling animals.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-04-40013-N.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aid T., Kazantseva A., Piirsoo M., Palm K., Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.* 2007;85:525-535.
- Altman J., Bayer S.A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 1990;301:365-381.
- Arnold S.E., Trojanowski J.Q. Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. *J. Comp. Neurol.* 1996;367:274-292.
- Baj G., Leone E., Chao M.V., Tongiorgi E. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:16813-16818.
- Calabrese F., Rossetti A.C., Racagni G., Gass P., Riva M.A., Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front. Cell Neurosci.* 2014;8:430. DOI 10.3389/fncel.2014.00430.eCollection 2014
- Chiaruttini C., Sonogo M., Baj G., Simonato M., Tongiorgi E. BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol. Cell. Neurosci.* 2008;37:11-19.
- Doosti M.-H., Bakhtiari A., Zare P., Amani M., Majidi-Zolbanin N., Babri S., Salari A.A. Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 2013;43:55-65.
- Duclot F., Kabbaj M. Individual differences in novelty seeking predict subsequent vulnerability to social defeat through a differential epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. *J. Neurosci.* 2013;33:11048-11060.
- Erburu M., Cajaleon L., Guruceaga E., Venzala E., Muñoz-Cobo I., Beltrán E., Puerta E., Tordera R.M. Chronic mild stress and imipramine treatment elicit opposite changes in behavior and in gene expression in the mouse prefrontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015;135:227-236.
- Farhang S., Barar J., Fakhari A., Mesgariabbasi M., Khani S., Omid Y., Farnam A. Asymmetrical expression of BDNF and NTRK3 genes

- in frontoparietal cortex of stress-resilient rats in an animal model of depression. *Synapse*. 2014;68:387-393.
- Grigoryan G.A., Dygalo N.N., Gekht A.B., Stepanichev M.Iu., Gulyaeva N.V. Molecular and cellular mechanisms of depression. Role of glucocorticoids, cytokines, neuro-transmitters, and trophic factors in genesis of depressive disorders. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk=Advance in Physiological Sciences (Moscow)*. 2014;45(2):3-19.
- Guan Z., Fang J. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav. Immun.* 2006;20:64-71.
- Ivanov A.D. The role of NGF and BDNF in mature brain activity regulation. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2014;64:137-146.
- Kawai T., Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 2007;13:460-469.
- Kranjac D., McLinden K.A., Deodati L.E., Papini M.R., Chumley M.J., Boehm G.W. Peripheral bacterial endotoxin administration triggers both memory consolidation and reconsolidation deficits in mice. *Brain Behav. Immun.* 2012;26:109-121.
- Laus M.F., Vales L.D., Costa T.M., Almeida S.S. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: A review of human and animal studies. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2011;8:590-612.
- Lehmann K., Rodriguez E.G., Kratz O., Moll G.H., Dawirs R.R., Teuchert-Noodt G. Early preweaning methamphetamine and postweaning rearing conditions interfere with the development of peripheral stress parameters and neural growth factors in gerbils. *Int. J. Neurosci.* 2007;117:1621-1638.
- Lipsky R.H., Xu K., Zhu D., Kelly C., Terhakopian A., Novelli A., Marini A.M. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J. Neurochem.* 2001;78:254-264.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- Loman M.M., Gunnar M.R. Early experience and the development of stress reactivity and regulation in children. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2010;34:867-876.
- Lubin F.D., Roth T.L., Sweatt J.D. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J. Neurosci.* 2008;28:10576-10586.
- Lucassen P.J., Naninck E.F., van Goudoever J.B., Fitzsimons C., Joels M., Korosi A. Perinatal programming of adult hippocampal structure and function; emerging roles of stress, nutrition and epigenetics. *Trends Neurosci.* 2013;36:621-631.
- Lyons M.R., West A.E. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog. Neurobiol.* 2011;94:259-295.
- O'Connor T.G., Ben-Shlomo Y., Heron J., Golding J., Adams D., Glover V. Prenatal anxiety predicts individual differences in cortisol in pre-adolescent children. *Biol. Psychiat.* 2005;58:211-217.
- Oskvig D.B., Elkahlon A.G., Johnson K.R., Phillips T.M., Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav. Immun.* 2012;26:623-634.
- Pruunsild P., Sepp M., Orav E., Koppel I., Timmusk T. Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J. Neurosci.* 2011;31:3295-3308.
- Rico J.L.R., Ferraz D.B., Ramalho-Pinto F.J., Morato S. Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats. *Behav. Brain Res.* 2010;215:102-109.
- Roth T.L., Lubin F.D., Funk A.J., Sweatt J.D. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF. *Biol. Psychiat.* 2009;65:760-769.
- Saha R.N., Liu X., Pahan K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J. Neuro-immune Pharmacol.* 2006;3:212-222.
- Sakharnova T.A., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its role in the functioning of the central nervous system. *Neyrokimiya=Neurochemistry (Moscow)*. 2012;29:269-277.
- Schmidt H.D., Sangrey G.R., Darnell S.B., Schassburger R.L., Cha J.H., Pierce R.C., Sadri-Vakili G. Increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the ventral tegmental area during cocaine abstinence is associated with increased histone acetylation at BDNF exon I-containing promoters. *J. Neurochem.* 2012;120:202-209.
- Shanks N., Larocque S., Meaney M.J. Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *Neurosci.* 1995;15:376-384.
- Sominsky L., Meehan C.L., Walker A.K., Bobrovskaya L., McLaughlin E.A., Hodgson D.M. Neonatal immune challenge alters reproductive development in the female rat. *Hormones Behav.* 2012a;62:345-355.
- Sominsky L., Walker A.K., Ong L.K., Tynan R.J., Walker F.R., Hodgson D.M. Increased microglial activation in the rat brain following neonatal exposure to a bacterial mimetic. *Behav. Brain Res.* 2012b;226:351-356.
- Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. *Biomed. Res. Int.* 2014;2014:932757. DOI 10.1155/2014/932757
- Tabuchi A. Synaptic plasticity-regulated gene expression: a key event in the long-lasting changes of neuronal function. *Biol. Pharm. Bull.* 2008;31:327-335.
- Tsankova N.M., Kumar A., Nestler E.J. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J. Neurosci.* 2004;24:5603-5610.
- Walker A.K., Hawkins G., Sominsky L., Hodgson D.M. Transgenerational transmission of anxiety induced by neonatal exposure to lipopolysaccharide: implications for male and female germ lines. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37:1320-1335.
- Walker A.K., Hiles S.A., Sominsky L., McLaughlin E.A., Hodgson D.M. Neonatal lipopolysaccharide exposure impairs sexual development and reproductive success in the Wistar rat. *Brain Behav. Immun.* 2011;25:674-684.
- Walker A.K., Nakamura T., Byrne R.J., Naicker S., Tynan R.J., Hunter M., Hodgson D.M. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:1515-1525.
- Yehuda R., Engel S.M., Brand S.R., Seckl J., Marcus S.M., Berkowitz G.S. Transgenerational effects of posttraumatic stress disorder in babies of mothers exposed to the World Trade Center attacks during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:4115-4118.
- Zhang J.C., Wu J., Fujita Y., Yao W., Ren Q., Yang C., Li S.X., Shiraayama Y., Hashimoto K. Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014;18. DOI 10.1093/ijnp/ipy077

Глюкокортикоидная гипотеза депрессии: история и перспективы

Г.Т. Шишкина¹✉, Н.Н. Дыгало^{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

Нарушение адаптации к неблагоприятным жизненным обстоятельствам считается одной из причин возникновения симптомов депрессии. Согласно глюкокортикоидной гипотезе, важная роль в индукции психоэмоционального расстройства принадлежит стрессорной активации гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС). Конечные гормоны этой системы, глюкокортикоиды, принимают важное участие в формировании многих физиологических и поведенческих ответов на стресс. И хотя острый гормональный ответ ГГАС на относительно непродолжительное воздействие обеспечивает быструю мобилизацию защитных сил организма, способствующую эффективному преодолению потенциально опасной ситуации, длительное повышение уровня гормонов может спровоцировать развитие нежелательных последствий, включающих депрессию. Наибольшее внимание при исследовании механизмов смены эффектов глюкокортикоидов с защитных на повреждающие привлекают глюкокортикоидные рецепторы (ГР). Эти рецепторы широко экспрессируются в мозге. Они являются важными регуляторами транскрипционной активности многих генов, в том числе и традиционно связанных с развитием психоэмоциональных отклонений, например, гена мозгового нейротрофического фактора (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF). Кроме прямого воздействия на транскрипционную активность генов-мишеней, изменение экспрессии самих ГР в результате действия стресса и/или глюкокортикоидов может модифицировать функциональные ответы на последующие стимулы. Анализ имеющихся в литературе сведений об эффектах стресса и глюкокортикоидов на экспрессию ГР в гиппокампе – структуре мозга, традиционно считающейся наиболее чувствительной к стрессу и принимающей важное участие в контроле эмоций, в связи с экспрессией BDNF и характером индуцируемых стрессорными и гормональными воздействиями психоэмоциональных ответов послужил целью настоящего обзора.

Ключевые слова: стресс; глюкокортикоидные рецепторы; BDNF.

The glucocorticoid hypothesis of depression: history and perspectives

G.T. Shishkina¹✉, N.N. Dygalo^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

An abnormality in adaptation to negative life events is considered as one of the main causes of the development of depressive symptoms. According to the corticosteroid receptor hypothesis of depression, stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis plays an important role in the induction of psycho-emotional disturbances. The end products of this axis, glucocorticoids, are involved in the formation of many physiological and behavioral responses to stress. Although the increase in hormone levels following a short-term intervention is directed towards rapid mobilization of the body's efforts for overcoming potentially dangerous situation, a long-term exposure to stress or glucocorticoids may have negative consequences for mood or behavior. With respect to mechanisms of changing effects of glucocorticoids from protective to damaging, glucocorticoid receptors (GRs) received most attention. These receptors are widely expressed in the brain. They are important regulators of the transcriptional activities of numerous genes, including the gene for such a plasticity-related protein as the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) which has been implicated in psychiatric disorders. In addition to direct effects on gene transcription, changes in expression of GR themselves resulting from stress and/or glucocorticoid effects, in turn can modify the functional responses to subsequent stimuli. The purpose of this review was to analyze available literature data on the effects of stress and glucocorticoids on the expression of GR in the hippocampus, which is traditionally considered as the most sensitive to stress brain structure. The review also addresses the implication of GR and BDNF interplay in the pathogenesis of stress-related disorders.

Key words: stress; glucocorticoid receptors; BDNF.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н. Глюкокортикоидная гипотеза депрессии: история и перспективы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):198-203. DOI 10.18699/VJ16.155

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shishkina G.T., Dygalo N.N. The glucocorticoid hypothesis of depression: history and perspectives. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):198-203. DOI 10.18699/VJ16.155

REVIEW

Received 08.12.2015 г.

Accepted for publication 12.02.2016 г.

© AUTHORS, 2016

Механизмы возникновения депрессии, несмотря на распространенность этой психопатологии и негативное влияние на жизнь общества, остаются в значительной степени неясными, сдерживая направленный поиск мишеней для разработки эффективных средств терапии. Решение проблемы осложняется множественностью путей, вовлекаемых в индукцию психоэмоциональных расстройств, а также в противодействие этой индукции, маскирующих в итоге реальный вклад отдельной системы или конкретного фактора в патофизиологию заболевания. Серьезным фактором риска развития депрессии считаются негативные жизненные обстоятельства (например смерть родственников, развод, унижения или поражения, безработица и ухудшение финансового состояния) (Post, 1992; Kendler et al., 1999; van Praag, 2004; Larkin et al., 2012). Несмотря на обширные адаптивные возможности организма, позволяющие большинству людей преодолевать без каких-либо психоэмоциональных последствий воздействие даже сильных стрессоров, чувствительные к стрессу взрослые индивиды, особенно предрасположенные к депрессии в результате неблагоприятных воздействий в ранние периоды жизни, могут отвечать депрессивными эпизодами на негативные события. Мета-анализ данных на выборке из 14 250 участников подтвердил наличие значительной связи между депрессией и перенесенным стрессом (Risch et al., 2009).

Среди различных изменений, индуцируемых стрессорными воздействиями в организме, высокий уровень глюкокортикоидов – следствие активированной при стрессе гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС) – считается одним из важных факторов, провоцирующих симптомы депрессии. Эта распространенная точка зрения подкрепляется наблюдениями депрессивных эпизодов, проявляющихся в качестве побочных эффектов повышенного уровня глюкокортикоидов, у пациентов с синдромом Кушинга (Kelly et al., 1983; Sonino et al., 1998) или при гормональной терапии (Brown et al., 2007). В соответствии с такими проявлениями у людей хроническое введение кортикостерона грызунам вызывало и у животных сопоставимые с клиническими симптомами депрессивно-подобные поведенческие изменения (Sterner, Kalynchuk, 2010). Наиболее значительным аргументом в пользу гипотезы связи высокого уровня кортизола с аффективными расстройствами служит известная в течение многих лет ассоциация депрессивных заболеваний с гиперактивацией ГГАС (Gibbons, 1964; Holsboer, Barden, 1996; Pariante, 2003; de Kloet et al., 2007; Mondelli et al., 2010; Saveanu, Nemeroff, 2012; Herbert, 2013). Более того, блокаторы синтеза глюкокортикоидов некоторое время активно пропагандировались в качестве эффективных средств антидепрессантной терапии (Jahn et al., 2004; Kling et al., 2009).

Вместе с тем, помимо этих данных, связывающих глюкокортикоиды с повышенной восприимчивостью к психопатологии, увеличение уровня гормонов является чрезвычайно важным для обеспечения адаптивных ответов на действие стрессора, включая и поведенческие ответы (Oitzl et al., 2010; Putman, Roelofs, 2011). Все больше, например, накапливается данных о том, что в зависимости от длительности воздействия глюкокортикоиды могут

оказать противоположное действие на депрессивно-подобное поведение животных. Так, ежедневное введение кортикостерона самцам мышей в течение шести дней оказывало антидепрессантный эффект, в то время как введение в течение 18 или 36 дней – выраженное про-депрессантное действие (Zhao et al., 2009). Кроме того, глюкокортикоиды, эффект которых – подавление нейрогенеза в гиппокампе (Gould, Tanapat, 1999; Kim et al., 2004; Mayer et al., 2006) – напрямую вовлекается в этиологию депрессии (Snyder et al., 2011; Lehmann et al., 2013), могут проявлять и нейротрофическую активность в этой области мозга (Gray et al., 2013). Накапливается также все больше свидетельств ассоциации высокого уровня глюкокортикоидов с антидепрессантным фенотипом (Barbier, Wang, 2009; Xu et al., 2009).

Роль глюкокортикоидных рецепторов в патофизиологии индуцируемой стрессом депрессии

Кажущаяся простой связь между повышенным уровнем глюкокортикоидов и развитием депрессии осложняется вовлечением в действие гормонов разных типов кортикостероидных рецепторов: минералокортикоидных (МР) и глюкокортикоидных (ГР) (Reul, de Kloet, 1985). Некоторые поведенческие эффекты МР и ГР оказались специфически зависимыми от области мозга и даже противоположными (Harris et al., 2013). МР с более низким сродством к глюкокортикоидам считаются полностью ими оккупированными уже при базальном уровне гормона, в то время как для оккупации ГР требуется сопоставимое со стрессорным повышение уровня гормонов в крови (de Kloet et al., 1993). Эти особенности исторически обусловили большее внимание к ГР как к рецепторам, опосредующим преимущественно стрессорные эффекты глюкокортикоидов.

Именно ослабление функции и/или экспрессии ГР считается ответственным за гиперактивацию ГГАС, отмечаемую у депрессивных больных (Holsboer, 2000; Pariante, Miller, 2001). В дексаметазоновом тесте нарушение механизма отрицательной обратной связи в ГГАС выявляется примерно у половины депрессивных больных. Среди структур мозга, снижение экспрессии ГР в которых, как полагают, вносит наибольший вклад в развитие депрессии, рассматриваются, прежде всего, гиппокамп, префронтальная кора и гипоталамус.

Многочисленные исследования показали способность стресса и глюкокортикоидов изменять экспрессию ГР в мозге (Sapolsky, McEwen, 1985; Reul et al., 1989; Fujikawa et al., 2000; Paskitti et al., 2000; Karandrea et al., 2002; Zhou et al., 2008; Wang et al., 2012; Shishkina et al., 2015). Выявляемые в этих исследованиях изменения оказались, однако, неоднозначными и могли зависеть даже от пола животного (Karandrea et al., 2002). Важным фактором, определяющим характер ответа ГР на стресс и глюкокортикоиды, может быть время определения экспрессии после начала воздействия, продемонстрированное, например, в работе японских исследователей (Fujikawa et al., 2000). Уровень мРНК ГР, исследованный в этой работе в зубчатой извилине гиппокампа крыс в разные промежутки времени после начала острого стрессорного воздействия ограничением

подвижности, был достоверно снижен в начале действия стрессора (на 41 % через 30 мин), но достоверно увеличен после двух часов воздействия. Ответ ГР может также зависеть от предрасположенности организма к индукции стрессорами депрессивно-подобного состояния. Например, полагают, что наибольшую опасность для возникновения психопатологии во взрослом возрасте представляет стресс, перенесенный в ранние периоды онтогенеза, как бы предрасполагающий организм к заболеванию в последующей жизни, особенно в условиях дополнительных негативных событий. В модельных экспериментах выяснилось изменение при этом характера ответа ГР на «взрослый» стресс. Так, взрослые самцы крыс, которых в течение первых 3 нед жизни подвергали стрессирующей процедуре отсаживания от матерей, демонстрировали после хронического стресса достоверное снижение ГР-иммунореактивности в СА1 области гиппокампа. В отличие от этих данных, у взрослых контрольных животных без отсаживания от матерей хронический стресс увеличивал ГР-иммунореактивность в СА1 области (Trujillo et al., 2016). Значительное влияние на ответ ГР к хроническому стрессу может оказать также продолжительность воздействия. Иммунореактивность рецепторов в дорзальном гиппокампе крыс была снижена после стресса, вызванного высаживанием животного на приподнятую открытую платформу, в течение пяти дней, но увеличена после 20-дневного воздействия (Robertson et al., 2005). Важным для ответа, очевидно, является и природа стрессора. Например, если после четырехнедельного стресса ограничения подвижности с погружением в воду наблюдалось увеличение экспрессии ГР в гиппокампе крыс (Mizoguchi et al., 2003), то после ежедневного сильного звука в течение 30 дней, напротив, происходило снижение экспрессии этих рецепторов (Eraslan et al., 2015). Индуцированное стрессом или глюкокортикоидами уменьшение экспрессии ГР в гиппокампе сопровождалось в ряде работ усилением симптомов депрессивно-подобного поведения (Skupio et al., 2015; Chen et al., 2016), что соответствовало глюкокортикоидной гипотезе депрессии.

Для выяснения, является ли дефицит ГР причиной возникновения депрессии и будет ли способствовать увеличение экспрессии рецепторов ослаблению симптомов заболевания, были использованы трансгенные животные. У мышей FBGRKO в двухмесячном возрасте 60 % нейронов гиппокампа лишены ГР, в возрасте 4–5 мес. таких нейронов уже 90–100 %, а после 6 мес. ГР отсутствуют во всем гиппокампе, а также во многих нейронах коры (Boyle et al., 2005). Протестированные в этой работе на поведенческую беспомощность и ангедонию животные не отличались от контроля по значениям этих показателей в двухмесячном возрасте и демонстрировали выраженные симптомы депрессивно-подобного состояния в возрасте 4 и 6 мес. В работе Ridder с коллегами (2005) увеличение депрессивно-подобного поведения наблюдалось уже после 50 %-го снижения экспрессии ГР в гиппокампе, а повышение экспрессии рецепторов (overexpression) снижало проявление поведенческой беспомощности после стресса и усиливало негативную обратную связь в регуляции ГГАС. Однако в некоторых работах показано, что снижение экспрессии рецепторов в областях переднего мозга

усиливало депрессивно-подобное поведение не во всех использованных тестах (Boulle et al., 2016), могло совсем не влиять на него (Vincent et al., 2013), а повышение так же, как и снижение экспрессии ГР, – увеличивать проявление этого поведения (Wei et al., 2004).

Взаимодействие глюкокортикоидных рецепторов и мозгового нейротрофического фактора в ответах на стресс

Поведенческие последствия изменения экспрессии рецепторов в обширных областях мозга могут складываться из специфических особенностей эффектов отдельных областей, например, обусловленных взаимодействием рецепторов в этих областях с другими функциональными системами, прежде всего серотонинергическими, активно вовлекаемыми в контроль психоэмоционального поведения. В последнее время появились свидетельства того, что стрессорные воздействия способны изменить, например, через усиление серотонинергической нейротрансмиссии (Robertson et al., 2005), не только экспрессию ГР в областях гиппокампа, но и функциональные, включая и транскрипционные (Datson et al., 2013), ответы этой структуры на последующее действие глюкокортикоидов, что рассматривается как часть молекулярного механизма чувствительности к индуцируемому стрессом психопатологиям.

Глюкокортикоидные рецепторы являются важными транскрипционными факторами, и в клетках мозга стрессированных животных наблюдается значительное увеличение транслокации гормон-рецепторного комплекса из цитоплазмы в ядро (Noguchi et al., 2010; Caudal et al., 2014). В дополнение к прямому влиянию на транскрипционную активность генов-мишеней вызванные стрессом изменения в экспрессии самих рецепторов могут модифицировать последующие ответы генов и связанных с ними функций на стресс, как было, например, показано для экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) (Alboni et al., 2011). В последнее время значительный интерес вызывает наличие возможного взаимодействия между стрессорными ответами ГР и BDNF в определении эффективности психоэмоциональной адаптации к стрессу (Arango-Lievano et al., 2015; Daskalakis et al., 2015).

Что касается BDNF, то в свое время многочисленные наблюдения изменений его экспрессии в ответ на стресс и повышение уровня глюкокортикоидов инициировали создание так называемой нейротрофической гипотезы депрессии. Было предположено, что низкий уровень BDNF, приводя к снижению количества клеток в мозге, является причиной возникновения этого заболевания, особенно индуцируемого стрессом, в то время как повышение уровня BDNF, активирующее нейрогенез, лежит в основе терапевтических эффектов антидепрессантов (Duman, Monteggia, 2006). Глюкокортикоиды могут регулировать экспрессию BDNF через активацию ГР как транскрипционных факторов (Hansson et al., 2006). Кроме того, глюкокортикоиды могут влиять на функции BDNF, активируя его Trk-рецепторы (Jeanneteau et al., 2008). Однако оказалось, что в ответ на стресс и глюкокортикоиды экспрессия BDNF в мозге, включая и гиппокамп, может не только снижаться, но и не изменяться и даже повышаться,

а сам по себе нейротрофин не достаточен для коррекции многих вызываемых стрессом негативных изменений в гиппокампальной структуре (Gray et al., 2013). Вместе с тем выяснилось, что мыши с генетически повышенной экспрессией ГР в отделах мозга, включая гиппокамп, и характеризующиеся устойчивостью к индукции стрессом депрессивно-подобного поведения, имели в гиппокампе, фронтальной коре и миндалине значительно большее содержание BDNF, чем животные дикого генотипа (Schulte-Herbrüggen et al., 2006). Было также обнаружено, что BDNF может влиять на ГР-специфический транскриптом, а совместное добавление дексаметазона и BDNF в культуру нейронов индуцировало экспрессию ГР-отвечающих генов, вовлекаемых в контроль нейронального роста и дифференцировки (Lambert et al., 2013). Такой эффект, как показано в этой работе, может быть обусловлен индукцией BDNF фосфорилирования ГР.

Взаимодействие BDNF и ГР полагают в настоящее время важным событием в патогенезе индуцируемых стрессом психопатологий. Комбинация одновременно низких уровней экспрессии ГР и BDNF способствует восприимчивости к развитию этих патологий как в подростковом, так и во взрослом возрасте, особенно в условиях дополнительных стрессорных воздействий (Daskalakis et al., 2015). Однако и высокие уровни этих параметров могут представлять риск если не развития, то, по крайней мере, усугубления негативных психоэмоциональных проявлений. Так, выживание индивида в угрожающих условиях зависит не только от сиюминутного ответа на стрессор, но и от способности запоминать и интегрировать информацию о действующем стрессоре с целью использовать этот опыт в будущем (Finsterwald, Alberini, 2014). Полагают, что активация ГР при стрессе способствует консолидации памяти через запуск BDNF/CREB(cAMP response element-binding protein)-зависимого пути (Finsterwald, Alberini, 2014). Однако остается неясным, как это согласуется с данными об угнетающем влиянии стресса и глюкокортикоидов на ГР и BDNF, а также с ослаблением под их действием когнитивных функций, включающих и память. В отличие от адаптивной формы памяти, формируемая в условиях стресса и длительно сохраняющаяся контекстуальная память «страха» усугубляет негативные психологические последствия стресса и затрудняет процесс реабилитации. Недавно показано (Revest et al., 2014), что в усиление этой памяти также вовлекается взаимодействие между ГР и BDNF. Авторы обнаружили, что активация ГР при стрессе в результате усиленной секреции глюкокортикоидов повышает экспрессию белков pro-BDNF и tPA (tissue plasminogen activator). Индукция tPA, в свою очередь, ускоряет процесс образования зрелой формы BDNF из pro-BDNF, что также приводит к увеличению уровня BDNF во время стресса и усилению через TrkB-Erk1/2^{МАРК} сигнальный путь контекстуальной памяти. Разрешение противоречий между вызываемыми стрессорами и глюкокортикоидами ослаблением когнитивных свойств и формированием адаптивной и патологической форм памяти и поведения, а также выяснение роли и механизмов действия ГР в этих эффектах требует дальнейших исследований.

Представленные в обзоре данные свидетельствуют о важной роли ГР в гибком контроле ответов организма на стресс и повышение уровня глюкокортикоидов, а также сложных молекулярных путей, вовлекаемых в обусловленные этими воздействиями поведенческие эффекты. Имеется все большее количество свидетельств взаимодействия ГР с BDNF, открывающих вопросы о механизмах этих взаимодействий, особенно в ранние периоды жизни индивида. Дальнейшее исследование этих механизмов и молекулярных путей будет способствовать развитию новых средств терапии психиатрических расстройств, обусловленных неблагоприятными стрессорными воздействиями.

Acknowledgments

The study was done as part of Budgeted Project 0324-2015-0014 and supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-07855-a.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alboni S., Tascadda F., Corsini D., Benatti C., Caggia F., Capone G., Barden N., Blom J.M., Brunello N. Stress induces altered CRE/CREB pathway activity and BDNF expression in the hippocampus of glucocorticoid receptor-impaired mice. *Neuropharmacology*. 2011;60(7/8):1337-1346.
- Arango-Lievano M., Lambert W.M., Bath K.G., Garabedian M.J., Chao M.V., Jeanneteau F. Neurotrophic-priming of glucocorticoid receptor signaling is essential for neuronal plasticity to stress and antidepressant treatment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015;112(51):15737-15742.
- Barbier E., Wang J.B. Anti-depressant and anxiolytic like behaviors in PKC1/HINT1 knockout mice associated with elevated plasma corticosterone level. *BMC Neurosci*. 2009;10:132.
- Boulle F., Velthuis H., Koedam K., Steinbusch H.W., van den Hove D.L., Kenis G., Gabriel C., Mocaer E., Franc B., Rognan D., Mongeau R., Lanfumey L. Behavioral and neurochemical characterization of TrkB-dependent mechanisms of agomelatine in glucocorticoid receptor-impaired mice. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 2016; 26(1):65-77.
- Boyle M.P., Brewer J.A., Funatsu M., Wozniak D.F., Tsien J.Z., Izumi Y., Muglia L.J. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005;102(2):473-478.
- Brown E.S., Vera E., Frol A.B., Woolston D.J., Johnson B. Effects of chronic prednisone therapy on mood and memory. *J. Affect. Disord*. 2007;99(1-3):279-283.
- Caudal D., Jay T.M., Godsil B.P. Behavioral stress induces regionally-distinct shifts of brain mineralocorticoid and glucocorticoid receptor levels. *Front. Behav. Neurosci*. 2014;8:19.
- Chen J., Wang Z.Z., Zuo W., Zhang S., Chu S.F., Chen N.H. Effects of chronic mild stress on behavioral and neurobiological parameters – role of glucocorticoid. *Horm. Behav*. 2016;78:150-159.
- Daskalakis N.P., De Kloet E.R., Yehuda R., Malaspina D., Kranz T.M. Early life stress effects on glucocorticoid-BDNF interplay in the hippocampus. *Front. Mol. Neurosci*. 2015;8:68.
- Datson N.A., van den Oever J.M., Korobko O.B., Magarinos A.M., de Kloet E.R., McEwen B.S. Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus. *Endocrinology*. 2013;154(9):3261-3272.

- de Kloet E.R., Derijk R.H., Meijer O.C. Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2007;3(2): 168-179.
- de Kloet E.R., Oitzl M.S., Joëls M. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol. Neurobiol.* 1993;13(4): 433-455.
- Duman R.S., Monteggia L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiat.* 2006;59(12):1116-1127.
- Eraslan E., Akyazi İ., Ergül-Ekiz E., Matur E. Noise stress-induced changes in mRNA levels of corticotropin-releasing hormone family molecules and glucocorticoid receptors in the rat brain. *Folia Biol. (Praha).* 2015;61(2):66-73.
- Finsterwald C., Alberini C.M. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2014;112:17-29.
- Fujikawa T., Soya H., Fukuoka H., Alam K.S., Yoshizato H., McEwen B.S., Nakashima K. A biphasic regulation of receptor mRNA expressions for growth hormone, glucocorticoid and mineralocorticoid in the rat dentate gyrus during acute stress. *Brain. Res.* 2000;874(2): 186-193.
- Gibbons J.L. Cortisol secretion rate in depressive illness. *Arch. Gen. Psychiat.* 1964;10:572-575.
- Gould E., Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiat.* 1999;46(11):1472-1479.
- Gray J.D., Milner T.A., McEwen B.S. Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. *Neuroscience.* 2013;239:214-227.
- Hansson A.C., Sommer W.H., Metsis M., Strömberg I., Agnati L.F., Fuxe K. Corticosterone actions on the hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression are mediated by exon IV promoter. *J. Neuroendocrinol.* 2006;18(2):104-114.
- Harris A.P., Holmes M.C., de Kloet E.R., Chapman K.E., Seckl J.R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(5): 648-658.
- Herbert J. Cortisol and depression: three questions for psychiatry. *Psychol. Med.* 2013;43(3):449-469.
- Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 2000;23(5):477-501.
- Holsboer F., Barden N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr. Rev.* 1996;17(2):187-205.
- Jahn H., Schick M., Kiefer F., Kellner M., Yassouridis A., Wiedemann K. Metyrapone as additive treatment in major depression: a double-blind and placebo-controlled trial. *Arch. Gen. Psychiat.* 2004;61(12):1235-1244.
- Jeanneteau F., Garabedian M.J., Chao M.V. Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(12):4862-4867.
- Karandrea D., Kittas C., Kitraki E. Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology.* 2002;75(4):217-226.
- Kelly W.F., Checkley S.A., Bender D.A., Mashiter K. Cushing's syndrome and depression – a prospective study of 26 patients. *Br. J. Psychiat.* 1983;142:16-19.
- Kendler K.S., Karkowski L.M., Prescott C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am. J. Psychiat.* 1999;156(6):837-841.
- Kim J.B., Ju J.Y., Kim J.H., Kim T.Y., Yang B.H., Lee Y.S., Son H. Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Brain Res.* 2004;1027(1/2):1-10.
- Kling M.A., Coleman V.H., Schulkin J. Glucocorticoid inhibition in the treatment of depression: can we think outside the endocrine hypothalamus? *Depress Anxiety.* 2009;26(7):641-649.
- Lambert W.M., Xu C.F., Neubert T.A., Chao M.V., Garabedian M.J., Jeanneteau F.D. Brain-derived neurotrophic factor signaling rewrites the glucocorticoid transcriptome via glucocorticoid receptor phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 2013;33(18):3700-3714.
- Larkin H., Shields J.J., Anda R.F. The health and social consequences of adverse childhood experiences (ACE) across the lifespan: an introduction to prevention and intervention in the community. *J. Prev. Interv. Commun.* 2012;40(4):263-270.
- Lehmann M.L., Brachman R.A., Martinowich K., Schloesser R.J., Herkenham M. Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. *J. Neurosci.* 2013;33(7):2961-2972.
- Mayer J.L., Klumpers L., Maslam S., de Kloet E.R., Joëls M., Lucassen P.J. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. *J. Neuroendocrinol.* 2006;18(8): 629-631.
- Mizoguchi K., Ishige A., Aburada M., Tabira T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience.* 2003;119(3):887-897.
- Mondelli V., Pariante C.M., Navari S., Aas M., D'Albenzio A., Di Forti M., Handley R., Hepgul N., Marques T.R., Taylor H., Papadopoulos A.S., Aitchison K.J., Murray R.M., Dazzan P. Higher cortisol levels are associated with smaller left hippocampal volume in first-episode psychosis. *Schizophr. Res.* 2010;119(1-3):75-78.
- Noguchi T., Makino S., Matsumoto R., Nakayama S., Nishiyama M., Terada Y., Hashimoto K. Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. *Endocrinology.* 2010;151(9):4344-4355.
- Oitzl M.S., Champagne D.L., van der Veen R., de Kloet E.R. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2010;34(6):853-866.
- Pariante C.M. Depression, stress and the adrenal axis. *J. Neuroendocrinol.* 2003;15(8):811-812.
- Pariante C.M., Miller A.H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol. Psychiat.* 2001;49(5):391-404.
- Paskitti M.E., McCreary B.J., Herman J.P. Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 2000;80(2):142-152.
- Post R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am. J. Psychiat.* 1992;149(8):999-1010.
- Putman P., Roelofs K. Effects of single cortisol administrations on human affect reviewed: Coping with stress through adaptive regulation of automatic cognitive processing. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36(4):439-448.
- Reul J.M., de Kloet E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 1985;117(6):2505-2511.
- Reul J.M., Pearce P.T., Funder J.W., Krozowski Z.S. Type I and type II corticosteroid receptor gene expression in the rat: effect of adrenalectomy and dexamethasone administration. *Mol. Endocrinol.* 1989; 3(10):1674-1680.
- Revest J.M., Le Roux A., Roullot-Lacarrière V., Kaouane N., Vallée M., Kasanetz F., Rougé-Pont F., Tronche F., Desmedt A., Piazza P.V. BDNF-TrkB signaling through Erk1/2 MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. *Mol. Psychiat.* 2014;19(9):1001-1009.
- Ridder S., Chourbaji S., Hellweg R., Urani A., Zacher C., Schmid W., Zink M., Hörtnagl H., Flor H., Henn F.A., Schütz G., Gass P. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J. Neurosci.* 2005;25(26):6243-6250.
- Risch N., Herrell R., Lehner T., Liang K.Y., Eaves L., Hoh J., Griem A., Kovacs M., Ott J., Merikangas K.R. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *J. Amer. Med. Assoc.* 2009;301(23): 2462-2471.
- Robertson D.A., Beattie J.E., Reid I.C., Balfour D.J. Regulation of corticosteroid receptors in the rat brain: the role of serotonin and stress. *Eur. J. Neurosci.* 2005;21(6):1511-1520.

- Sapolsky R.M., McEwen B.S. Down-regulation of neural corticosterone receptors by corticosterone and dexamethasone. *Brain. Res.* 1985;339(1):161-165.
- Saveanu R.V., Nemeroff C.B. Etiology of depression: genetic and environmental factors. *Psychiatr. Clin. North. Am.* 2012;35(1):51-71.
- Schulte-Herbrüggen O., Chourbaji S., Ridder S., Brandwein C., Gass P., Hörtnagl H., Hellweg R. Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. *Psychoneuroendocrinology.* 2006;31(10):1266-1277.
- Shishkina G.T., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Behavioral effects of glucocorticoids during the first exposures to the forced swim stress. *Psychopharmacology (Berl.).* 2015;232(5):851-860.
- Skupio U., Tertilt M., Sikora M., Golda S., Wawrzczak-Bargiela A., Przewlocki R. Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. *Neuroscience.* 2015;286:141-150.
- Snyder J.S., Soumier A., Brewer M., Pickel J., Cameron H.A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature.* 2011;476(7361):458-461.
- Sonino N., Fava G.A., Raffi A.R., Boscaro M., Fallo F. Clinical correlates of major depression in Cushing's disease. *Psychopathology.* 1998;31(6):302-306.
- Sterner E.Y., Kalynchuk L.E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 2010;34(5):777-790.
- Trujillo V., Durando P.E., Suárez M.M. Maternal separation in early life modifies anxious behavior and Fos and glucocorticoid receptor expression in limbic neurons after chronic stress in rats: effects of tianeptine. *Stress.* 2016;19(1):91-103.
- van Praag H.M. Can stress cause depression? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 2004;28(5):891-907.
- Vincent M.Y., Hussain R.J., Zampi M.E., Sheeran K., Solomon M.B., Herman J.P., Khan A., Jacobson L. Sensitivity of depression-like behavior to glucocorticoids and antidepressants is independent of forebrain glucocorticoid receptors. *Brain Res.* 2013;1525:1-15.
- Wang Q., Yu K., Wang J., Lin H., Wu Y., Wang W. Predator stress-induced persistent emotional arousal is associated with alterations of plasma corticosterone and hippocampal steroid receptors in rat. *Behav. Brain Res.* 2012;230(1):167-174.
- Wei Q., Lu X.Y., Liu L., Schafer G., Shieh K.R., Burke S., Robinson T.E., Watson S.J., Seasholtz A.F., Akil H. Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101(32):11851-11856.
- Xu Z., Hou B., Zhang Y., Gao Y., Wu Y., Zhao S., Zhang C. Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2009;19(12):868-875.
- Zhao Y., Xie W., Dai J., Wang Z., Huang Y. The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. *Brain. Res.* 2009;1261:82-90.
- Zhou J., Li L., Tang S., Cao X., Li Z., Li W., Li C., Zhang X. Effects of serotonin depletion on the hippocampal GR/MR and BDNF expression during the stress adaptation. *Behav. Brain Res.* 2008;195(1):129-138.

Функциональное состояние нигростриатной системы крыс линии Крушинского – Молодкиной в ходе аудиогенных судорог

Н.А. Дорофеева, Л.С. Никитина, Д.В. Зосен, М.В. Глазова, Е.В. Черниговская 

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Нейрохимические механизмы запуска и реализации судорожного припадка при эпилепсии в настоящее время остаются мало изученными и практически нет работ, оценивающих состояние нейромедиаторных систем на ранних этапах судорожных припадков на генетических моделях животных с повышенной судорожной готовностью. Было проведено исследование роли ERK1/2 киназ (extracellular signal-regulated kinase) в регуляции активности глутамат-, ГАМК- и дофаминергических нейронов нигростриатной системы крыс линии Крушинского – Молодкиной на клонико-тонической стадии и на стадии атаксии аудиогенного судорожного припадка. Показано, что при предъявлении крысам линии Крушинского – Молодкиной специфического звукового раздражителя происходит увеличение активности ERK1/2 киназ в стриатуме и в черной субстанции по сравнению с интактными крысами Крушинского – Молодкиной, что сопровождается усилением активности Synapsin 1. В результате активации экзоцитоза усиливается выброс глутамата в стриатуме, что приводит к инициации судорог. Однако на стадии клонико-тонических стадий в стриатуме мы выявили ряд изменений, приводящих к остановке судорожного припадка. Повышение фосфорилирования тирозин-гидроксилазы в компактной части черной субстанции за счет усиления активности ERK1/2 киназ приводит к интенсивному выбросу дофамина в стриатуме. При этом происходит увеличение содержания D2- и снижение D1-рецепторов, что указывает на ослабление D1 (проэпилептического) и активации D2 (антиэпилептического) зависимых путей регуляции ГАМК-ергических нейронов черной субстанции. Мы показали увеличение содержания ферментов синтеза ГАМК в ретикулярной части черной субстанции, что, возможно, приводит к ингибированию глутаматергических нейронов таламуса и является одним из механизмов торможения судорожной активности на стадии атаксии.

Ключевые слова: крысы Крушинского – Молодкиной; иммуногистохимия; Вестерн блоттинг; нигростриатная система; дофаминергические нейроны; D2- и D1-рецепторы дофамина; ERK1/2; глутамат; ГАМК; Synapsin 1.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Дорофеева Н.А., Никитина Л.С., Зосен Д.В., Глазова М.В., Черниговская Е.В. Функциональное состояние нигростриатной системы крыс линии Крушинского – Молодкиной в ходе аудиогенных судорог. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):204-211. DOI 10.18699/VJ16.146

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dorofeeva N.A., Nikitina L.S., Zosen D.V., Glazova M.V., Chernigovskaya E.V. Functional state of the nigrostriatal system of Krushinsky – Molodkina rats during audiogenic seizure expression. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):204-211. DOI 10.18699/VJ16.146

ORIGINAL ARTICLE

Received 25.09.2015 г.

Accepted for publication 20.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

Functional state of the nigrostriatal system of Krushinsky – Molodkina rats during audiogenic seizure expression

N.A. Dorofeeva, L.S. Nikitina, D.V. Zosen, M.V. Glazova, E.V. Chernigovskaya 

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

Neurochemical mechanisms of initiation and expression of epileptic seizures are poorly explored, and there are no published data that could demonstrate the functional state of the neuromediator systems at the initial state of seizure in the animals genetically prone to seizure. In the current work, we studied the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) in the regulation of the nigrostriatal glutamate, GABA and dopamine neurons of Krushinsky – Molodkina rats at clonus-tonus and ataxia stages of audiogenic seizure. We demonstrated upregulation of ERK1/2 activity upon audio stimulation which was accompanied by increased activation of Synapsin I in the striatum and substantia nigra in comparison to intact Krushinsky – Molodkina rats. The observed exocytosis activation led to secretion of glutamate in the striatum and, as a result, to stimulation of seizures. However, at clonus-tonus stage in the striatum we revealed the changes that could participate in further inhibition of seizure activity, such as increased phosphorylation of tyrosine hydroxylase upon increased ERK1/2 activity followed by activation of dopamine release in the pars compacta of the substantia nigra. At the same time, enhanced D2 and increased D1 dopamine receptor contents were observed. These data revealed attenuation of direct (pro-seizure) and indirect (anti-seizure) pathways of the regulation of the substantia nigra GABA neurons. We demonstrated activation of GABA in the substantia nigra pars reticulata, which probably results in the inhibition of glutamate neurons of the thalamus and could be one of the mechanisms inhibiting seizure activity during ataxia.

Key words: Krushinsky – Molodkina rats; immunohistochemistry; Western blot; nigrostriatal bundle; dopamine neurons; D1 and D2 dopamine receptors; ERK1/2; glutamate; GABA; Synapsin 1.

Эпилепсия – одно из распространенных неврологических заболеваний, которым страдают 0,5–1 % мирового населения (Hauser, 1994). В настоящее время для изучения механизмов формирования эпилептиформной активности широко используются экспериментальные модели аудиогенной эпилепсии на животных, имеющих генетическую предрасположенность к судорожным припадкам. Одной из таких экспериментальных моделей являются крысы инбредной линии Крушинского–Молодкиной (Крушинский, 1960). Животные этой линии, характеризующиеся двухволновым клонико-тоническим припадком, который возникает у них в ответ на звук высокой мощности, были получены на основе аутбредной популяции крыс Вистар.

Значительную роль в регуляции двигательной активности, в том числе судорожных припадков, играет комплекс структур базальных ганглиев (Deransart, Deraulis, 2002). Центральным звеном системы базальных ганглиев можно считать стриатум, в котором происходит сбор и анализ информации, приходящей из других отделов мозга (Graybiel, 1990; Gurney et al., 2004).

В работе рассмотрена дорсолатеральная часть стриатума, которая, помимо глутаматергических проекций из сенсомоторной и ассоциативной областей коры, иннервируется дофаминергическими нейронами черной субстанции, в свою очередь, получающими проекции от ГАМК-ергических нейронов стриатума (Lynd-Balta, Haber, 1994; Durieux et al., 2012). В настоящее время принято различать две субпопуляции длинноаксонных умеренно-шипиловых ГАМК-ергических нейронов, различающихся по направлению эфферентных проекций и составу экспрессируемых белков. Первая субпопуляция нейронов иннервирует ретикулярную часть черной субстанции, характеризуется экспрессией рецептора дофамина D1 и дает начало просудорожному прямому пути базальных ганглиев. Вторая субпопуляция направляет отростки к бледному шару, экспрессирует рецептор дофамина D2 и дает начало непрямому антисудорожному пути базальных ганглиев (Gerfen et al., 1990; Le Moine, Bloch, 1995).

Эпилептиформные состояния обусловлены нарушением механизмов, которые обеспечивают баланс между возбуждающими и тормозными системами мозга – дофамин-, глутамат- и ГАМК-ергическими, в том числе в базальных ганглиях. Нарушение взаимодействия этих систем может происходить на уровне нарушения синтеза нейромедиаторов, рецепторного связывания и на этапе их выведения за счет изменения в процессах экзоцитоза (Bradford, Peterson, 1987; Scharfman, 2007). Одним из координирующих механизмов влияния дофамина и глутамата на активность ГАМК-ергических нейронов стриатума является ERK1/2 сигнальный каскад (Valjent et al., 2000; Guerrero et al., 2002; Chen et al., 2004; Nateri et al., 2007). Связывание D1-рецептора с медиатором вызывает активацию ERK1/2, что, в свою очередь, повышает активность NR2B субъединицы NMDA-рецептора (Greengard, 2001; Lee et al., 2002). Стимуляция кортикостриатальных проекций вызывает активацию фосфорилирования ERK1/2 киназ в D2-позитивных нейронах стриатума (Sgambato et al., 1998; Gerfen et al., 2002; Kotecha et al., 2002; Bertran-Gonzalez et al., 2008).

На различных моделях было показано, что ERK1/2 киназы играют важную роль в формировании различных форм эпилепсии у человека и животных (Nateri et al., 2007; O'Sullivan et al., 2008; Lindgren et al., 2009; Osterweil et al., 2010; Glazova et al., 2015). Некоторые авторы рассматривают возможность использования функций ERK1/2 и их блокаторов в фармакологии (Nateri et al., 2007; Sebolt-Leopold, Herrera, 2004). Все это позволяет предположить участие ERK1/2 киназ в регуляции активности нейронов нигростриатной системы в ходе аудиогенных судорожных припадков.

ERK1/2 киназы оказывают влияние на процессы биосинтеза нейромедиаторов. Например, они являются одним из факторов активации тирозингидроксилазы, фосфорилируя ее по серину-31 (Hauck et al., 1992). ERK1/2 киназы могут не только регулировать интенсивность фосфорилирования ТГ, но и влиять на экспрессию гена тирозингидроксилазы, что приводит к усилению биосинтеза дофамина (DeCastro et al., 2005; Shah et al., 2006; Björklund, Dunnett, 2007). ERK1/2 киназы могут принимать участие в регуляции нейрональной активности также на этапе выведения нейротрансмиттеров, за счет активации синтеза и/или активности белков экзоцитоза, фосфорилируя Synapsin 1 (Murray et al., 1998; Longuet et al., 2005; Vara et al., 2009; Benagiano et al., 2011). При этом показано, что белки экзоцитоза вносят существенный вклад в процесс эпилептогенеза. Многие авторы рассматривают Synapsin 1 как один из важнейших элементов этого процесса (Yamagata et al., 1995; Garcia et al., 2004; Etholm, Heggelund, 2009; Vara et al., 2009; Fassio et al., 2011; Ketzeff et al., 2011).

ERK1/2 являются также важным компонентом, вызывающим индукцию глутаматергической синаптической активности, обусловленной усилением экспрессии VGLUT2 (vesicular glutamate transporter 2) (Doyle et al., 2010), являющегося одним из маркеров интенсивности выведения глутамата. Кроме того, известна связь между нарушением экспрессии VGLUT2 и повышенной судорожной активностью (Schallier et al., 2009). Ранее нами было показано, что инактивация ERK1/2 привела к отмене или снижению тяжести судорожных припадков у крыс линии Крушинского–Молодкиной, что сопровождалось торможением выведения глутамата, вызванного снижением уровня фосфорилированного Synapsin 1 в гиппокампе. Это позволило предположить важную роль ERK1/2 в инициации судорожной активности (Glazova et al., 2015).

Целью нашего исследования являются изучение особенностей ответа нигростриатной системы крыс линии Крушинского–Молодкиной, имеющих генетическую предрасположенность к аудиогенным эпилептиформным припадкам, и исследование роли ERK1/2 киназ в эпилептогенезе. В работе показано, что в момент возникновения судорожной активности происходит значительная активация ERK1/2 киназ как в стриатуме, так и в черной субстанции, что, очевидно, приводит к изменению в состоянии дофамин-, глутамат- и ГАМК-ергических систем нигростриатного комплекса.

Материалы и методы

В качестве модели исследования судорожной готовности выбраны крысы инбредной линии Крушинского – Молодкиной с наследственной аудиогенной эпилепсией. Крысы Крушинского – Молодкиной отвечают на звуковой стимул полным и стабильным клонико-тоническим судорожным припадком в 99 % случаев. Повышенная судорожная готовность полностью формируется у них к концу третьего месяца жизни, и по достижении этого возраста они отвечают стабильным судорожным припадком на звуковой сигнал (Семиохина и др., 2006). В наших экспериментах крыс содержали в индивидуальных клетках вивария при естественном освещении и свободном доступе к пище и воде. Все процедуры проводили согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. В работе использовали крыс весом 250–300 г старше трех мес. Судорожная активность у крыс линии Крушинского – Молодкиной вызывалась звуковым стимулом (интенсивностью 50 дБ, частотой 10 кГц), подаваемым с генератора. Судорожное поведение крыс тестировалось по следующим характеристикам: наличие и длительность латентного периода аудиогенного припадка, «дикого бега», клонических и тонических судорог и атаксии. Все крысы были подвергнуты звуковой стимуляции за две недели до начала эксперимента для проверки их готовности к судорожным припадкам и первая, контрольная, группа крыс была выведена из эксперимента без предъявления звукового стимула. Крыс этого же возраста второй группы подвергали звуковой стимуляции и декапитировали на стадии клонико-тонических судорог после предъявления звукового сигнала. Крысы третьей группы были декапитированы на стадии атаксии. Все три группы животных были выведены из эксперимента в один день. Мозг разделяли на две половины в сагиттальной плоскости. Далее из одной половины иссекали стриатум и черную субстанцию для приготовления проб для последующего биохимического (Вестерн-блот) анализа. Вторую половину мозга фиксировали в 4 %-м параформальдегиде, разведенном на фосфатном буфере и охлажденном до 4 °С для последующего иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимический метод. После стандартной предварительной обработки срезы инкубировали с первичными антителами к GAD67 (1:750, Millipore); GAD65 (1:750, Abcam); VGLUT2 (1:200, Abcam); фосфо-Synapsin 1 (1:500, ProSci Incorporated); фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (1:250, Cell Signaling Technology), фосфо-тирозингидроксилазе (Ser31) (1:1000, Millipore), тирозингидроксилазе (1:1000, Sigma-Aldrich), D1a- и D2-рецепторам (1:1000, Millipore) в течение 12 ч при комнатной температуре. После промывки в PBS срезы обрабатывали биотинилированными вторичными антителами (Vector Labs) и стрептавидин-пероксидазным комплексом (Sigma Aldrich). Проявление реакции проводили с помощью диаминобензидина (0,05 %) с добавлением перекиси водорода (0,01 %). Иммуногистохимические реакции на каждый белок проводились одновременно на всех срезах в стандартных условиях. Для оценки специфичности иммунного окрашивания в каждом случае делали отрица-

тельный контроль (выполнение иммуногистохимической реакции без первичных антител), результатом чего было отсутствие иммунного окрашивания. Анализ производили с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Imager A1.

Вестерн-блоттинг. Для приготовления проб из мозга иссекали стриатум и черную субстанцию. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE). Далее белковые фракции переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences, Freiburg, Германия). Использовали те же первичные антитела, что и при иммуногистохимическом анализе. Для визуализации результатов использовали ECL plus-систему (Amersham Biosciences). Денситометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ. Уровень экспрессии специфических белков был скорректирован по сигналу GAPDH, выявляемому для определения уровня общего количества белка в пробах. Уровень фосфорилирования ERK1/2 киназ и тирозингидроксилазы был скорректирован по уровню общего количества этих белков в пробах.

Морфофункциональный анализ материала. Количественная оценка содержания исследуемых веществ в стриатуме и черной субстанции проводилась на основании измерения оптической плотности иммунореактивного вещества в телах нейронов или волокнах на микрофотографиях с помощью программного обеспечения Видео-Тест, а также на пленках Вестерн-блот анализа с помощью программного обеспечения ImageJ. Данные были выражены в условных единицах оптической плотности. Кроме оценки содержания в нейронах иммунореактивного вещества, в некоторых случаях проводился подсчет количества нейронов, давших интенсивную иммуногистохимическую реакцию на выявляемые белки.

Статистический анализ результатов. Все полученные данные обрабатывали статистически по *t*-критерию Стьюдента, а также по критерию Манна–Уитни, при оценке достоверности отличий между группами *n* = количеству животных в группе. В каждой экспериментальной группе было исследовано по пять крыс. Данные представлены в виде среднего значения по каждой группе животных ± стандартное отклонение для среднего значения. Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Изменение активности глутаматергических нейронов в стриатуме крыс Крушинского – Молодкиной при предъявлении звукового сигнала. В стриатуме на стадии клонико-тонических судорог наблюдалось значительное снижение уровня VGLUT2 (рис. 1, а–г). Эти данные подтверждает увеличение фосфорилирования Synapsin 1 (рис. 1, д, е), вызванное повышенной активностью ERK1/2 киназ (рис. 1, ж). На стадии атаксии, несмотря на высокое содержание фосфо-ERK1/2 киназ, количество активных форм Synapsin 1 снижается, хоть и остается несколько выше контрольного уровня (рис. 1, з). Видимо, это приводит к снижению интенсивности выброса глутамата на стадии атаксии и накоплению его в терминальных отделах, что выражается в повышении содержания VGLUT2 (рис. 1, а).

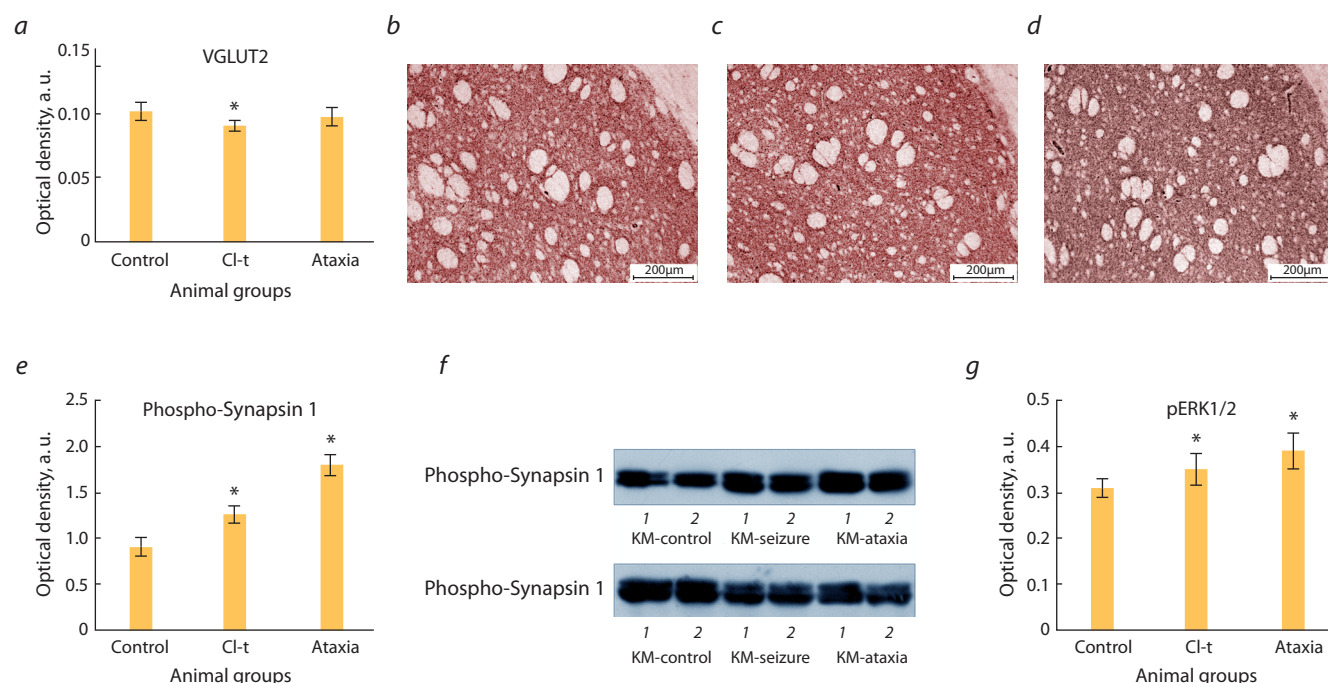


Fig. 1. Contents of (a) VGLUT2, (e) phospho-Synapsin 1, and (g) phospho-ERK1/2 in the striatum of Krushinsky–Molodkina rats of the control group at tonic-clonic seizure and ataxia.

The contents of (a) VGLUT2 and (g) phospho-ERK1/2 were assessed from their immunoreactivities on histological slices. (f) The expression level of phospho-Synapsin 1 was evaluated by Western blot analysis. Optical density is expressed in arbitrary units as mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ vs. tonic-clonic seizure. Immunohistochemical detection of VGLUT2 in the striatum of KM rats: (b) in the control, (c) at tonic-clonic seizure, and (d) ataxia.

Изменение активности ГАМК-ергических нейронов в стриатуме и черной субстанции крыс Крушинского–Молодкиной при предъявлении звукового сигнала. Содержание GAD67 увеличивается уже на этапе возникновения судорожной активности и остается повышенным до конца стадии атаксии (рис. 2, а, б).

В волокнах ретикулярной части черной субстанции крыс Крушинского–Молодкиной на всех этапах судорог наблюдается повышение содержания белка GAD67 (рис. 3, а, б), что говорит об усилении уровня синтеза ГАМК. Содержание GAD65 на клонико-тонической стадии снижается (рис. 3, в), это свидетельствует об интенсивном выбросе ГАМК в данной структуре и может приводить к торможению ГАМК-ергических нейронов черной субстанции.

Изменение активности дофаминергических нейронов в стриатуме и черной субстанции крыс Крушинского–Молодкиной при предъявлении звукового сигнала. Вызванный специфическим звуковым стимулом судорожный припадок у крыс Крушинского–Молодкиной характеризуется повышением активности дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции, о чем свидетельствует увеличение содержания фосфотирозингидроксилазы на фоне снижения общего количества белка тирозингидроксилазы (рис. 4, а–з), что коррелирует с повышением активности ERK1/2 киназ. В стриатуме также отмечено повышение уровня фосфотирозингидроксилазы при увеличении содержания общей тирозингидроксилазы (рис. 4, д, е).

Повышенная активность дофаминергических нейронов черной субстанции приводит к повышению уровня D2-рецепторов стриатума на стадии клонико-тонических судорог (рис. 5, а, б), в то время как содержание D1 снижено (рис. 5, в–е). Однако уже на стадии атаксии содержание D2-рецепторов дофамина возвращается к контрольному уровню (рис. 5, а, б).

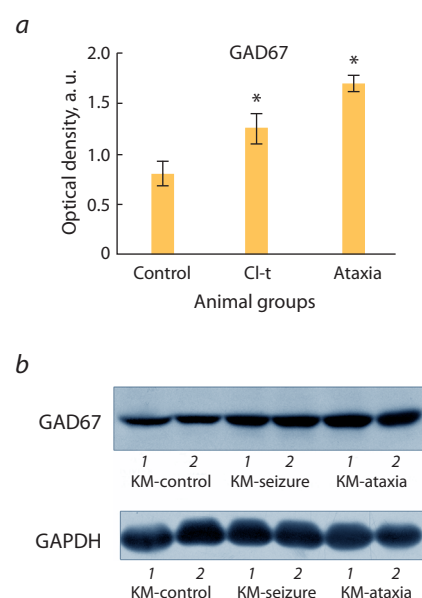


Fig. 2. Contents of GAD67 (a, b) in the striatum of Krushinsky–Molodkina rats in the control at tonic-clonic seizure and ataxia measured by Western blot analysis.

Optical density is presented in arbitrary units. Data are shown as mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$ vs. control.

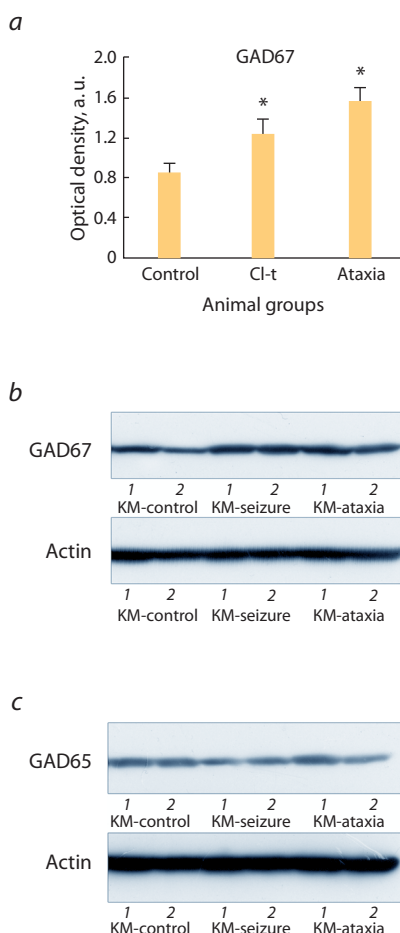


Fig. 3. Contents of (a, b) GAD67 and (c) GAD65 in the substantia nigra of Krushinsky – Molodkina rats in the control and at tonic-clonic seizure and ataxia measured by Western blotting.

Optical density is presented in arbitrary units. Data are shown as mean $\pm$ SE. * p < 0.05 vs. control.

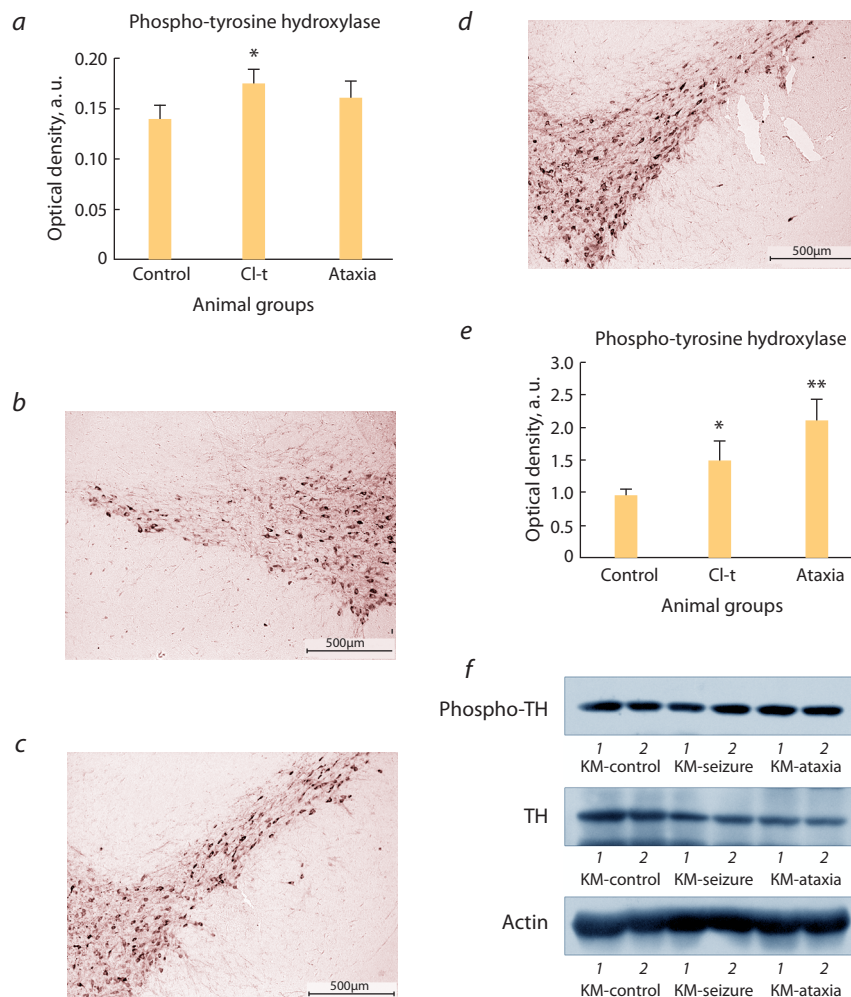


Fig. 4. Contents of phospho-tyrosine hydroxylase determined by immunohistochemical methods in the substantia nigra (a): (b) in the control, (c) at tonic-clonic seizure, and (d) at ataxia. (e, f) Contents of phospho-tyrosine hydroxylase in the striatum measured by Western blotting.

Optical density is presented in arbitrary units. Data are shown as mean $\pm$ SE. * p < 0.05 vs. control.

Обсуждение

Нейрохимические механизмы запуска и реализации судорожного припадка при эпилепсии в настоящее время остаются малоизученными. Нами было проведено сопоставление состояния основных нейромедиаторных систем nigrostriатного комплекса крыс Крушинского – Молодкиной на клонико-тонической стадии и стадии атаксии. При этом необходимо отметить, что интерпретировать характер изменений при взятии мозга на стадии клонико-тонического припадка сложно. С одной стороны, это могут быть механизмы, направленные на запуск судорожной активности, с другой – выявленные

изменения могут являться результатом истощения активно работающих нейромедиаторных систем, что приводит к прекращению припадка и переходу крыс в стадию атаксии.

Судорожный припадок у крыс линии Крушинского – Молодкиной развивается в течение нескольких секунд после предъявления звукового сигнала, что заставляет предположить, что на нейрохимическом уровне изменения активности возбуждающих и тормозных нейротрансмиттеров должны быть связаны с быстрыми процессами, в том числе с выбросом нейротрансмиттеров в синапсах. Действительно, зависимость эпилептиформной активности от уровня экспрессии белков, отвечающих за выведение нейротрансмиттеров, была показана в экспериментах на нокаутных животных (Kataoka et al., 2011; Matveeva et al., 2012; Corradini et al., 2014). Кроме того, вероятен вклад изменения баланса фосфорилирования – дефосфорилирования белков в реализацию судорожного припадка. Нами ранее было показано, что крысы Крушинского – Молодкиной в интактном состоянии характеризуются повышенным содержанием VGLUT2 в стриатуме, являющегося маркером глутаматергических нейронов (Dorofeeva et al., 2015). Мы предположили, что это свидетельствует о накоплении нейромедиатора в терминальных отделах из-за нарушения его

выведения в результате пониженной интенсивности фосфорилирования Synapsin 1 (Dorofeeva et al., 2015). На клонико-тонической стадии судорожного припадка наблюдается повышение содержания фосфо-Synapsin 1 на фоне усиливающейся активности ERK1/2 киназ. Все это сопровождается заметным снижением количества VGLUT2 в стриатуме, что, вероятно, свидетельствует об активном выбросе медиатора в синаптическое пространство и связывании глутамата с рецепторами экспрессируемыми ГАМК-ергическими нейронами. Ранее было показано, что снижение уровня фосфорилирования Synapsin 1 при инактивации ERK1/2 киназ в ходе аудиогенного припадка сопровождается накоплением VGLUT2 в стриатуме, а также в гиппокампе (Glazova et al., 2015). Совокупность этих данных указывает на зависимость выброса глутамата от активности ERK1/2 киназ. Таким образом, интенсивная нейротрансмиссия глутамата в стриатуме является одной из возможных причин возникновения судорожного припадка.

Быстрое увеличение содержания выявляемых белков на стадии клонико-тонических судорог вызывает удивление, однако различия, описанные нами, являются статистически достоверными. Мы показали повышение GAD67 в стриатуме на клонико-тонической стадии (приблизительно через 20–30 с после подачи звука), что можно рассматривать как начальный этап восстановления запасов ГАМК, израсходованного в предыдущие этапы судорожного припадка, так как известно, что GAD67, являющийся конститутивным белком, в основном отвечает за синтез ГАМК (Asada et al., 1997). Дальнейшее увеличение его содержания на стадии атаксии может являться одной из причин остановки судорожного припадка. Интенсивность синтеза ГАМК в стриатуме в большой степени зависит от активности дофаминергической системы черной субстанции. На стадии клонико-тонических судорог мы отметили повышение уровня фосфорилирования тирозингидроксилазы по Ser31 в компактной части черной субстанции. Активация тирозингидроксилазы может быть следствием

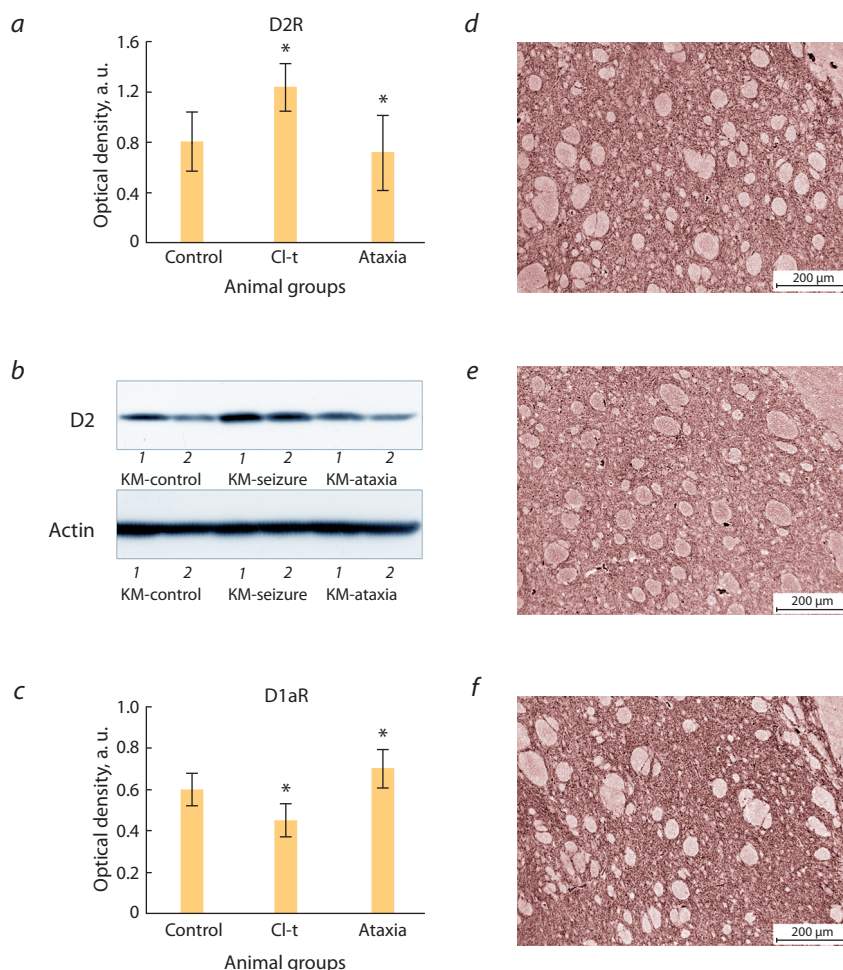


Fig. 5. Contents of (a, b) dopamine D2 receptors detected by Western blotting and (c) D1 receptors in Krushinsky–Molodkina rats revealed by immunohistochemistry: (d) in control, (e) at tonic-clonic seizure, and (f) at ataxia.

Optical density is presented in arbitrary units. Data are shown as mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$ vs. control.

усиления фосфорилирования ERK1/2 киназ при предъявлении крысам звукового сигнала. Кроме того, при подаче звукового сигнала на фоне увеличения активности дофаминергических нейронов черной субстанции происходит изменение содержания рецепторов дофамина в стриатуме: повышение уровня D2 и снижение D1. В настоящее время показано, что оба типа этих рецепторов вовлечены в регуляцию активности ГАМК-ергических нейронов стриатума. Стимуляция D1 приводит к усилению, в то время как стимуляция D2 приводит к ослаблению выведения ГАМК в экспериментах *in vivo* и *in vitro* (Girault et al., 1986; Bernath, Zigmond, 1989; Floran et al., 1990). На основании полученных результатов и данных литературы можно сделать вывод о том, что в момент судорожного припадка у крыс Крушинского–Молодкиной происходит интенсивный выброс дофамина в стриатуме, вызывающий увеличение экспрессии D2-рецепторов дофамина и последующее торможение выброса ГАМК D2-экспрессирующими ГАМК-ергическими нейронами стриатума. Это приводит к инактивации непрямого (антисудорожного) пути регуляции ГАМК-ергических нейронов черной субстанции. Снижение содержания рецепторов на клонико-тонической стадии приводит также к торможению выведения ГАМК. В результате происходит также инактивация прямого (протрудорожного) пути регуляции ГАМК-ергических нейронов черной субстанции,

что приводит к активации этих нейронов, о чем свидетельствует повышение содержания GAD65 в ретикулярной части черной субстанции. Усиление тормозного влияния ГАМК-ергических нейронов ретикулярной части черной субстанции на глутаматергические нейроны таламуса, очевидно, приводит к снижению моторной активности на стадии атаксии.

Несмотря на сложность интерпретации и необходимость критической оценки полученных результатов, мы рискнули сделать следующее заключение. Одной из основных причин возникновения судорожного припадка можно считать активацию ERK1/2 киназ в стриатуме крыс Крушинского – Молодкиной, приводящую к интенсивному фосфорилированию Synapsin 1. Повышенная активность ERK1/2-зависимого белка Synapsin 1 в стриатуме сопровождается уменьшением содержания VGLUT2, что свидетельствует об усилении экзоцитоза глутамата. Однако на стадии клонико-тонических стадий мы выявили ряд изменений в стриатуме, приводящих к остановке судорожного припадка. Повышение фосфорилирования тирозингидроксилазы в компактной части черной субстанции за счет усиления активности ERK1/2 киназ вызывает интенсивный выброс дофамина в стриатуме. При этом мы наблюдаем увеличение содержания D2- и снижение D1-рецепторов, что указывает на ослабление D1 и D2 опосредованных путей регуляции стриатумом ГАМК-ергических нейронов черной субстанции, приводящее к усилению их активности и, как следствие, к ингибированию глутаматергических нейронов таламуса, что, возможно, является одним из механизмов торможения судорожной активности.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-04-01431.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Asada H., Kawamura Y., Maruyama K., Kume H., Ding R.-G., Kanbara N., Kuzume H., Sanbo M., Yagi T., Obata K. Cleft palate and decreased brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1997; 94(12):6496-6499.

Benagiano V., Lorusso L., Flace P., Girolamo F., Rizzi A., Bosco L., Cagiano R., Nico B., Ribatti D., Ambrosi G. VAMP-2, SNAP-25A/B and syntaxin-1 in glutamatergic and GABAergic synapses of the rat cerebellar cortex. *BMC Neurosci.* 2011;12(1):118.

Bernath S., Zigmond M.J. Dopamine may influence striatal GABA release via three separate mechanisms. *Brain Res.* 1989;476(2): 373-376.

Bertran-Gonzalez J., Bosch C., Maroteaux M., Matamalas M., Hervé D., Valjent E., Girault J.-A. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J. Neurosci.* 2008;28(22): 5671-5685.

Björklund A., Dunnett S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 2007;30(5):194-202.

Bradford H.F., Peterson D. Current views of the pathobiochemistry of epilepsy. *Mol. Aspects Med.* 1987;9(2):119-172.

Chen J., Rusnak M., Luedtke R.R., Sidhu A. D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J. Biol. Chem.* 2004;279(38):39317-39330.

Corradini I., Donzelli A., Antonucci F., Welzl H., Loos M., Martucci R., De Astis S., Pattini L., Inverardi F., Wolfer D., Caleo M., Bozzi Y., Verderio C., Frassoni C., Braida D., Clerici M., Lipp H.P., Sala M., Matteoli M. Epileptiform activity and cognitive deficits in SNAP-25(+/-) mice are normalized by antiepileptic drugs. *Cereb. Cortex.* 2014;24(2):364-376.

DeCastro M., Nankova B.B., Shah P., Patel P., Mally P.V., Mishra R., La Gamma E.F. Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. *Mol. Brain Res.* 2005;142(1):28-38.

Deransart C., Depaulis A. The control of seizures by the basal ganglia? A review of experimental data. *Epileptic Disord.* 2002;4(3):61-72.

Dorofeeva N.A., Glazova M.V., Khudik K.A., Nikitina L.S., Kirillova D., Chernigovskaya E.V. [Comparative Study of Nigrostriatal Systems in Wistar Rats and Rats Prone to Seizures]. *Zh. Evol. Biohim. Fiziol.* 2015;51(3):204-213.

Doyle S., Pyndiah S., De Gois S., Erickson J.D. Excitation-transcription coupling via calcium/calmodulin-dependent protein kinase/ERK1/2 signaling mediates the coordinate induction of VGLUT2 and Narp triggered by a prolonged increase in glutamatergic synaptic activity. *J. Biol. Chem.* 2010;285(19):14366-14376.

Durieux P.F., Schiffmann S.N., de Kerchove d'Exaerde A. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *EMBO J.* 2012;31(3):640-653.

Etholm L., Heggelund P. Seizure elements and seizure element transitions during tonic-clonic seizure activity in the synapsin I/II double knockout mouse: a neuroethological description. *Epilepsy Behav.* 2009;14(4):582-590.

Fassio A., Raimondi A., Lignani G., Benfenati F., Baldelli P. Synapsins: from synapse to network hyperexcitability and epilepsy. *Seminars in cell developmental biology.* Elsevier. 2011;22:408-415.

Florán B., Aceves J., Sierra A., Martínez-Fong D. Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci. Lett.* 1990;116(1):136-140.

García C., Blair H., Seager M., Coulthard A., Tennant S., Buddles M., Curtis A., Goodship J. Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J. Med. Genet.* 2004;41(3):183-186.

Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F., Sibley D.R. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 1990; 250(4986):1429-1432.

Gerfen C.R., Miyachi S., Paletzki R., Brown P. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J. Neurosci.* 2002; 22(12):5042-5054.

Girault J.A., Barbeito L., Spampinato U., Gozlan H., Glowinski J., Beson M.J. In vivo release of endogenous amino acids from the rat striatum: further evidence for a role of glutamate and aspartate in corticostriatal neurotransmission. *J. Neurochem.* 1986;47(1):98-106.

Glazova M.V., Nikitina L.S., Hudik K.A., Kirillova O.D., Dorofeeva N.A., Korotkov A.A., Chernigovskaya E.V. Inhibition of ERK1/2 signaling prevents epileptiform behavior in rats prone to audiogenic seizures. *J. Neurochem.* 2015;132(2):218-229.

Graybiel A.M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1990;3(7):244-254.

Greengard P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science.* 2001;294(5544):1024-1030.

Guerrero C., Pesce L., Lecuona E., Ridge K.M., Sznajder J.I. Dopamine activates ERKs in alveolar epithelial cells via Ras-PKC-dependent and Grb2/Sos-independent mechanisms. *Am. J. Physiol.-Lung Cell Mol. Physiol.* 2002;282(5):L1099-L1107.

Gurney K., Prescott T.J., Wickens J.R., Redgrave P. Computational models of the basal ganglia: from robots to membranes. *Trends Neurosci.* 2004;27(8):453-459.

- Hauser W.A. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*. 1994;35(s2):S1-S6.
- Haycock J.W., Ahn N.G., Cobb M.H., Krebs E.G. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1992;89(6):2365-2369.
- Kataoka M., Yamamori S., Suzuki E., Watanabe S., Sato T., Miyaoaka H., Azuma S., Ikegami S., Kuwahara R., Suzuki-Migishima R., Nakahara Y., Nihonmatsu I., Inokuchi K., Katoh-Fukui Y., Yokoyama M., Takahashi M. A single amino acid mutation in SNAP-25 induces anxiety-related behavior in mouse. *PLoS One*. 2011;6(9):e25158.
- Ketzel M., Kahn J., Weissberg I., Becker A., Friedman A., Gitler D. Compensatory network alterations upon onset of epilepsy in synapsin triple knock-out mice. *Neuroscience*. 2011;189:108-122.
- Kotecha S.A., Oak J.N., Jackson M.F., Perez Y., Orser B.A., Van Tol H.H., MacDonald J.F. A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron*. 2002;35(6):1111-1122.
- Krushinskij L.V. Formirovanie povedeniya zhivotnykh v norme i patologii [Formation of Animal Behavior in Health and Disease]. Moscow, Moscow State University Publ., 1960.
- Le Moine C., Bloch B. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 1995;355(3):418-426.
- Lee F.J., Xue S., Pei L., Vukusic B., Chéry N., Wang Y., Wang Y.T., Niznik H.B., Yu X.M., Liu F. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*. 2002;111(2):219-230.
- Lindgren H.S., Ohlin K.E., Cenci M.A. Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in L-DOPA-induced angiogenic activity in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(12):2477-2488.
- Longuet C., Broca C., Costes S., Hani E.H., Bataille D., Dalle S.P. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 β -cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology*. 2005;146(2):643-654.
- Lynd-Balta E., Haber S. The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience*. 1994;59(3):625-640.
- Matveeva E.A., Price D.A., Whiteheart S.W., Vanaman T.C., Gerhard G.A., Slevin J.T. Reduction of vesicle-associated membrane protein 2 expression leads to a kindling-resistant phenotype in a murine model of epilepsy. *Neuroscience*. 2012;202:77-86.
- Murray B., Alessandrini A., Cole A.J., Yee A.G., Furshpan E.J. Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1998;95(20):11975-11980.
- Nateri A.S., Raivich G., Gebhardt C., Da Costa C., Naumann H., Vreugdenhil M., Makwana M., Brandner S., Adams R.H., Jefferys J.G. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J.* 2007;26(23):4891-4901.
- O'Sullivan G.J., Dunleavy M., Hakansson K., Clementi M., Kinsella A., Croke D.T., Drago J., Fienberg A.A., Greengard P., Sibley D.R. Dopamine D1 vs D5 receptor-dependent induction of seizures in relation to DARPP-32, ERK1/2 and GluR1-AMPA signaling. *Neuropharmacology*. 2008;54(7):1051-1061.
- Osterweil E.K., Krueger D.D., Reinhold K., Bear M.F. Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* 2010;30(46):15616-15627.
- Schallier A., Massie A., Loyens E., Moechars D., Drinkenburg W., Michotte Y., Smolders I. vGLUT2 heterozygous mice show more susceptibility to clonic seizures induced by pentylenetetrazol. *Neurochem. Int.* 2009;55(1):41-44.
- Scharfman H.E. The neurobiology of epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci.* 2007;7(4):348-354.
- Sebolt-Leopold J.S., Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;4(12):937-947.
- Semiohina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva I.I. Krushinsky–Molodkina rats: study of audiogenic epilepsy, cardiovascular events, and behavior. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova*=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 2006;56(3):298-316.
- Sgambato V., Pagès C., Rogard M., Besson M.-J., Caboche J. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. *J. Neurosci.* 1998;18(21):8814-8825.
- Shah P., Nankova B.B., Parab S., La Gamma E.F. Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein. *Brain Res.* 2006;1107(1):13-23.
- Valjent E., Corvol J.-C., Pagès C., Besson M.-J., Maldonado R., Caboche J. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* 2000;20(23):8701-8709.
- Vara H., Onofri F., Benfenati F., Sassoè-Pognetto M., Giustetto M. ERK activation in axonal varicosities modulates presynaptic plasticity in the CA3 region of the hippocampus through synapsin I. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2009;106(24):9872-9877.
- Yamagata Y., Obata K., Greengard P., Czernik A. Increase in synapsin I phosphorylation implicates a presynaptic component in septal kindling. *Neuroscience*. 1995;64(1):1-4.

Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами

Е.В. Сухарева¹✉, Т.С. Калинина^{1, 2}, В.В. Булыгина¹, Н.Н. Дыгало^{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 основе долговременных изменений нейробиохимических систем мозга и регулируемых ими физиологических функций и поведения под действием неблагоприятных факторов раннего онтогенеза находится изменение экспрессии важных для функционирования нейробиохимической системы генов. Ключевой фермент биосинтеза катехоламинов, тирозингидроксилаза (ТГ), определяет активность нейробиохимической системы и индуцируется гормонами стресса, глюкокортикоидами, *in vitro* и *in vivo*. Анализ собственных и литературных данных по влиянию гормонов стресса – глюкокортикоидов – в критические периоды перинатального онтогенеза на экспрессию гена ТГ, уровень его белка и активность фермента в процессе развития, а также рассмотрение возможных механизмов такого влияния послужило задачей обзора. Введение дексаметазона или гидрокортизона повышает через 6 ч уровень мРНК ТГ в стволе мозга 20-суточных плодов и трехдневных крысят, что сопровождается увеличением активности фермента и иммуногистохимически выявляемого белка ТГ в стволе мозга. Изменение экспрессии гена ТГ в критический период раннего развития приводит к повышению уровня мРНК ТГ в стволе мозга 25- и 70-дневных крысят и активности фермента в стволе и коре мозга взрослых животных. Период чувствительности ТГ к уровню глюкокортикоидов зависит от возраста. Введение гормонов на восьмой день жизни не сопровождается изменениями в уровне мРНК и активности фермента. Промотор гена ТГ не имеет классического функционально активного гормонозависимого элемента. Механизм гормональной индукции экспрессии ТГ может быть основан на неканоническом пути действия глюкокортикоидов в результате известного белок-белкового взаимодействия глюкокортикоидного рецептора с другими транскрипционными факторами, такими как белки AP-1 комплекса. Именно этот механизм регуляции экспрессии ТГ дексаметазоном установлен для культуры феохромоцитомы. Доказательство существования подобного механизма для глюкокортикоидной регуляции ТГ *in vivo* необходимо для понимания многообразия уровней регуляции экспрессии нейрогенов факторами внешней среды.

Ключевые слова: тирозингидроксилаза; глюкокортикоиды; онтогенетическое программирование; экспрессия генов; головной мозг.

Tyrosine hydroxylase of the brain and its regulation by glucocorticoids

E.V. Sukhareva¹✉, T.S. Kalinina^{1, 2}, V.V. Bulygina¹, N.N. Dygalo^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Early life stress events can produce long-lasting changes in neurochemistry and behaviors related to monoamine systems, with increased risks of cardiovascular, metabolic, neuroendocrine, psychiatric disorders, generalized anxiety and depression in adulthood. Tyrosine hydroxylase (TH), the key enzyme for catecholamine synthesis, also plays an important role in the activity of the noradrenergic system and may be a target for glucocorticoids during the perinatal programming of physiological functions and behavior. Administration of hydrocortisone or dexamethasone to female rats on day 20 of pregnancy and to 3-day-old neonatal pups significantly increased TH mRNA levels (real-time PCR) and enzyme activity as well as protein levels determined by ICH in the locus coeruleus. Moreover, our treatment led to increase in TH mRNA levels in 25- and 70-day-old animals, as well as an increase in enzyme activity in the brainstem and cerebral cortex of adult rats. The long-term changes in TH expression are limited by the perinatal period of development. Administration of hormones on day 8 of life was not accompanied by changes in TH mRNA levels or enzyme activity. Glucocorticoids use several mechanisms to bring about transactivation or transrepression of genes. The main mechanism includes direct binding of the hormone-activated GRs to glucocorticoid responsive elements (GREs) in the promoter region of genes. However, despite optimistic claims made the classical GRE was not found in the TH gene promoter. Protein-protein interactions between hormone-activated GR and other transcription factors, for example, AP-1, provide an additional mechanism for the effects of glucocorticoids on gene expression. An important feature of this mechanism is its dependence on the composition of proteins formed by AP-1. Hormone-activated GRs are able to enhance gene expression when AP-1 consists of the Jun/Jun homodimer, but do not do that when AP-1 appears as the Jun/Fos heterodimer. Furthermore, as has been shown recently, the GRE/AP-1 composite site is the major site of interaction of glucocorticoids with

the TH gene in the pheochromocytoma cell line. Ontogenetic variation in the expression of Fos and Jun family proteins, which affects their ratio, can be one of the reasons for the TH gene regulation by glucocorticoids at near-term fetuses and neonates. However, to date this hypothesis has been supported only by *in vitro* data, and the existence of this mechanism in *in vivo* conditions needs to be explored in further studies.

Key words: tyrosine hydroxylase; glucocorticoids; ontogenetic programming; gene expression; brain.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Сухарева Е.В., Калинина Т.С., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):212-219. DOI 10.18699/VJ16.156

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Tyrosine hydroxylase of the brain and its regulation by glucocorticoids. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):212-219. DOI 10.18699/VJ16.156

Неблагоприятные условия протекания перинатального онтогенеза, как правило, стрессорные, вызывают долговременные, сохраняющиеся на протяжении длительного периода времени, последствия. Это фундаментальное явление, подкрепленное эпидемиологическими данными, получило название «онтогенетическое программирование» (Barker, 1995). Повышение уровня гормонов стресса, глюкокортикоидов, и даже такие слабые воздействия, как снижение качества материнской заботы в первые дни/месяцы жизни, нарушают функционирование медиаторных систем и регулируемых ими разных форм поведения, в том числе сопряженных со страхом и тревожностью (Harris, Seckl, 2011; Markham, Koenig, 2011; Bingham et al., 2013; Gallo et al., 2013; Reynolds, 2013). Несмотря на очевидную важность выяснения процессов, обеспечивающих долговременное программирование нейрoхимии мозга и поведения, механизмы, лежащие в их основе, до сих пор остаются до конца неясными. Как было показано, в том числе и в наших исследованиях, даже кратковременное изменение экспрессии ключевых для функции нейрoхимической системы генов в критические периоды онтогенеза способно в дальнейшем вызывать изменение психоэмоциональных реакций (Shishkina et al., 2004a, b; Dygalo et al., 2008).

Норадренергическая система мозга, наряду с серотонинергической, относится к модулирующим медиаторным системам и принимает непосредственное участие в регуляции многих физиологических систем и функций, а также различных психопатологий. Ключевым ферментом синтеза норадреналина, определяющим функцию медиаторной системы, является тирозингидроксилаза (ТГ) (Kvetnansky et al., 2009; Tekin et al., 2014). Экспрессия гена этого фермента, не имеющего классического функционально активного гормонозависимого элемента (Sabban, Kvetnansky, 2001), тем не менее, индуцируется глюкокортикоидами *in vitro* и *in vivo* (Rani et al., 2009; Kalinina et al., 2012). Анализ собственных и литературных данных по влиянию гормонов стресса – глюкокортикоидов – в критические периоды перинатального онтогенеза на экспрессию гена ТГ, уровень его белка и активность фермента в процессе развития, а также рассмотрение возможных механизмов такого влияния послужили задачей данного обзора.

Тирозингидроксилаза: ген, белок, локализация

Тирозингидроксилаза (EC 1.14.16.2) – фермент, который лимитирует скорость биосинтеза дофамина и норадреналина, превращая тирозин в диоксифенилаланин (ДОФА) с использованием молекулярного кислорода и кофактора – тетрагидробиоптерина (Nagatsu et al., 1964; Kvetnansky et al., 2009; Tekin et al., 2014).

В геноме большинства организмов ген ТГ присутствует в виде одной копии, за исключением костистых рыб (Candy, Collet, 2005; Yamamoto et al., 2010), с разным числом экзонов: семь у дрозофилы (Friggi-Grelín et al., 2003), 13 у большинства млекопитающих, 14 у человека (Lenartowski, Goc, 2011). Ген ТГ человека расположен на коротком плече 11-й хромосомы (Craig et al., 1986; Bademci et al., 2012). Соседство последовательности, кодирующей ТГ, с последовательностью инсулиноподобного гена эволюционно сохранилось в хромосомах позвоночных (Hernandez-Sanchez et al., 2006). В геноме мыши такая синтенная область находится в конце 7-й, а у крыс – 1-й хромосомы (Tekin et al., 2014). У большинства млекопитающих с гена ТГ синтезируется только один транскрипт (Hauck, 2002). У крысы его длина составляет около 1800 нуклеотидов, из которых 1494 кодируют собственно полипептидную цепь фермента, а 35 – в 5'- и 265 – в 3'-области являются некодирующими участками (Kvetnansky et al., 2009; Lenartowski, Goc, 2011). В головном мозге и надпочечниках человека обнаружены четыре формы как мРНК, так и, собственно, белка ТГ, отличающиеся наличием 1b и/или 2 экзонов и 4 и/или 27 аминокислот соответственно (Tekin et al., 2014). Сравнительный анализ промоторов ТГ человека, крысы и мыши выявил пять гомологичных областей, при этом общая гомология между промоторами ТГ человека и мыши составляет 47 %, а человека и крысы – не более 30 % (Romano et al., 2005).

Стабильность и активность фермента, а также кинетические свойства его различных изоформ определяются длиной последовательности нуклеотидов, с которой происходит синтез самого белка, и числом сайтов фосфорилирования мРНК. Трансляция проходит не со всех существующих форм мРНК ТГ (Hauck, 2002). Изменения в стабильности мРНК ТГ и существование различных транскриптов за счет альтернативного сплайсинга предо-

ставляют дополнительные возможности для регуляции экспрессии ТГ (Kumer, Vrana, 1996; Tekin et al., 2014).

Белок фермента представляет собой тетрамер, состоящий из 498 аминокислот в каждой субъединице с вариабельным N-концевым регуляторным и консервативным каталитическим доменом на С-конце молекулы. Именно каталитические домены участвуют в образовании тетрамера по типу «лейциновых застёжек» (Tekin et al., 2014).

ТГ экспрессируется в катехоламинергических нейронах периферической и центральной нервной системы, а также в хромоаффинных клетках мозгового вещества надпочечников. Фермент обеспечивает как базальный уровень дофамина и норадреналина, так и необходимое изменение уровней нейромедиаторов при действии эндо- и экзогенных стимулов. Максимальная активность фермента в ЦНС представлена в области перикарионов катехоламинергических нейронов (продолговатый и средний мозг, область моста), минимальная – в области их терминалей (кора, гиппокамп, мозжечок). Дефинитивные уровни экспрессии гена, белка и активность фермента устанавливаются в процессе развития.

Экспрессия тирозингидроксилазы в онтогенезе

Развитие нейромедиаторных систем мозга определяется последовательной активацией каскада морфогенов и транскрипционных факторов (Goridis, Rohrer, 2002). Пусковым фактором при специализации дорзальной части нервной трубки, из которой и закладываются нейроны синего пятна ствола мозга, основного источника норадренергических нейронов, выступает костный морфогенетический белок (BMP) (Altmann, Brivanlou, 2001; Vogel-Hörpker, Rohrer, 2002). Уровень экспрессии BMP определяет место локализации перикарионов этих нейронов – чем сильнее экспрессия белка, тем более дорзально закладываются нейроны, продуцирующие норадреналин (Barth et al., 1999; Guo et al., 1999). Снижение уровня эндогенного BMP уменьшает число ТГ-позитивных клеток в культуре клеток ствола мозга 13-суточных эмбрионов мыши (Holm et al., 2006). Восьмой фактор роста фибробластов (FGF8) является координатором развития клеток синего пятна совместно с морфогеном Sonic Hedgehog (SHH), регулируя формирование истмуса – границы между задним, где и формируются норадренергические нейроны, и средним мозгом (Wurst, Bally-Cuif, 2001; Holm et al., 2006). Экспрессия каудальнее истмуса генов *Eg1* и *Eg2*, гомологичных генам сегментации насекомых, обеспечивает корректное образование клеток синего пятна у мышей (Simon et al., 2005). Нормальное развитие нейронов синего пятна происходит благодаря последовательной активации четырех транскрипционных факторов: *Mash1*, *Phox2a*, *Phox2b* и *Rnx/Tlx3* (Morin et al., 1997; Hirsch et al., 1998; Pattyn et al., 2000; Qian et al., 2001).

При формировании норадренергических нейронов в симпатической нервной системе последовательность активации транскрипционных факторов отлична от таковой в головном мозге (Goridis, Rohrer, 2002; Hippenmeyer et al., 2004), что свидетельствует о сложном программировании развития нейронов разного происхождения, даже использующих один и тот же нейротрансмиттер. Вместе с тем

транскрипционные факторы *Mash1* и *Phox2b* являются основными детерминантами формирования норадренергического фенотипа и мозга, и периферии. В целом морфогенез норадренергической системы головного мозга начинается в конце первой половины эмбриогенеза, проходит с достаточно высокой скоростью и завершается в раннем постнатальном периоде развития (Herlenius, Lagercrantz, 2004).

Одновременно с закладкой норадренергических нейронов ствола мозга начинается экспрессия гена ТГ. В стволовой части мозга грызунов мРНК и белок ТГ детектируются на 8-й–10-й день эмбрионального развития (Thomas et al., 1995; Fujinaga, Scott, 1997), в гипоталамусе активность фермента определяется с 13-го, а в коре мозга с 18-го дня пренатального развития (Puymirat et al., 1982). Низкий у новорожденных крыс уровень мРНК ТГ с возрастом увеличивается, но динамика изменения экспрессии гена и активности фермента в разных отделах мозга имеет региональные особенности (Bonnin et al., 1994; Калинина, Дыгало, 2013). Уровень экспрессии гена, белка и активности ТГ, характерный для взрослых животных, устанавливается к полуторамесячному возрасту. При этом наиболее быстрые периоды формирования нейрхимической системы, опережающие общее развитие организма, у крыс приходятся на конец пренатального онтогенеза и четвертую неделю жизни (Kalinina et al., 2012). Воздействие именно в эти сроки приводит к долговременному изменению медиаторной системы и регулируемых ее функций, что позволяет считать данные периоды развития критическими в онтогенезе норадренергической медиаторной системы (Дыгало, Калинина, 1993; Калинина, Дыгало, 2013).

Для нормального развития организма ТГ абсолютно необходима (Carson, Robertson, 2002; Lopez-Sanchez et al., 2010), нокауты по гену ТГ летальны из-за патологии сердечно-сосудистой системы (Zhou et al., 1995). Введение ДОФА во время беременности позволяет таким животным родиться, но без дальнейшей терапии они гибнут в первые недели жизни. Фермент меланоцитов – тирозиназа – способен синтезировать дофамин и норадреналин в обход синтеза из ДОФА. Поэтому пигментированные нокауты по гену ТГ выживают. Двойные нокауты по ТГ и тирозиназе также летальны (Rios et al., 1999). Но даже пигментированные нокауты по ТГ мельче своих сородичей дикого генотипа, имеют пониженный тонус сосудов и дезорганизацию кардиомиоцитов в целом. Несмотря на заместительную терапию ДОФА, у таких мышей снижены содержание катехоламинов в надпочечниках и мозге, уровень кортикостерона в крови (Kobayashi et al., 1995; Bornstein et al., 2000).

В целом экспрессия ТГ в мозге прогрессивно повышается со второй половины эмбрионального развития, достигая к полуторамесячному возрасту уровня, характерного для взрослых животных. Транскрипция ТГ находится под контролем целого ряда регуляторных факторов, взаимодействующих с промоторной областью гена.

Регуляция экспрессии тирозингидроксилазы

Активация уже имеющихся молекул ТГ регулируется обратимыми реакциями фосфорилирования – дефосфо-

рирования. ТГ имеет сайты фосфорилирования тремя классами протеинкиназ: цАМФ-зависимыми, кальций-кальмодулин-зависимыми, цГМФ-зависимыми. Основными сайтами фосфорилирования являются серины в 8-, 19-, 31- и 40-м положении N-регуляторного домена белка, при этом Ser-31 и Ser-40 вносят наиболее существенный вклад в активацию фермента и присутствуют у видов, имеющих множественные формы фермента (Dunkley et al., 2004; Lenartowski, Goc, 2011; Tekin et al., 2014).

Все катехоламины ингибируют активность ТГ по механизму отрицательной обратной связи, нарушая сродство фермента к кофактору. Активность ТГ снижается при усилении обратного захвата медиаторов и увеличивается при повышенном выбросе в синаптическую щель (Lenartowski, Goc, 2011). Аллостерические изменения конформации белковой молекулы ТГ при взаимодействии с полианионами – гепарином, фосфолипидами и т. п. – повышают активность ТГ (Kumer, Vrana, 1996; Tekin et al., 2014). В естественных условиях ТГ активируется в ответ на иммобилизационный стресс как в надпочечниках, так и в синем пятне головного мозга, и эти эффекты опосредованы различными транскрипционными факторами, активация которых зависит от длительности стресса (Sabban et al., 2004; Hebert et al., 2005; Kvetnansky et al., 2009). Транскрипционная регуляция гена ТГ является комплексной и тканеспецифичной, поскольку зависит от пула транскрипционных факторов в ткани. Существует видовая специфичность распределения регуляторных элементов в промоторах мышей, крыс и человека (Romano et al., 2005).

Экспрессия гена регулируется позитивными и негативными регуляторными элементами промотора гена ТГ (Sabban, Kvetnansky, 2001; Kvetnansky et al., 2009). В промоторной области гена фермента известны множественные транскрипционные фактор-связывающие сайты: два AP-1, SP-1, AP-2; два CRE; Oct/HEPT мотив; E-box/бивалент и другие, которые позволяют различным факторам, таким как Ca^{2+} , глюкокортикоиды, уровень кислорода и стресс, регулировать уровень мРНК ТГ (Kvetnansky et al., 2009; Rani et al., 2009; Lenartowski, Goc, 2011). Наибольший вклад в регуляцию транскрипции ТГ вносят AP-1 (–205/–195) и CRE (–45/–38) элементы промотора.

CRE/CaRE (TGACGTCA) является элементом, обеспечивающим основной и индуцированный уровни экспрессии гена ТГ (Rani et al., 2009; Lenartowski, Goc, 2011) при изменении в клетке уровней цАМФ и Ca^{2+} , а также в ответ на действие агонистов холинергических рецепторов, форболового эфира, никотина, что увеличивает транскрипцию гена ТГ. При этом для максимального ответа гена ТГ на цАМФ-зависимые процессы необходима активация двух цАМФ-зависимых сайтов, расположенных в области –102 и –73 п. н. (Nagamoto-Combs et al., 1997).

Проксимальный AP-1 (TGATTCA) элемент промотора ТГ определяет уровень транскрипции гена ТГ в ответ на воздействие Ca^{2+} , агонистов мускариновых рецепторов, гипоксии, форболовых эфиров. В целом наличие в 5'-области гена ТГ сайтов AP-1 и CRE высоко консервативно и обнаружено у всех исследованных на данный момент видов (Lenartowski, Goc, 2011). Помимо активирующих транскрипцию элементов, в промоторе ТГ имеются регуляторные сайты, подавляющие экспрессию гена,

например гептамер (HEPT), расположенный между AP-1 и CRE/CaRE, который взаимодействует с Oct-2 и ингибирует транскрипцию гена фермента (Lenartowski, Goc, 2011).

Исследования последних лет свидетельствуют о важном вкладе пост-транскрипционных процессов в изменение активности ТГ головного мозга (Tank et al., 2008; Boschi et al., 2015) и надпочечников (Sun et al., 2004). Усиление транскрипции гена ТГ может сопровождаться увеличением стабильности ее мРНК. Установлено, что удлинение времени полужизни мРНК ТГ при гипоксии происходит в результате взаимодействия РНК со специфическим белком, защищающим ее от нуклеаз (Paulding et al., 2002).

В целом, несмотря на многолетние исследования регуляции транскрипции и трансляции ТГ, до настоящего времени многие детали этих процессов остаются неясными. Как утверждают авторы обзоров, посвященных этим вопросам (Lenartowski, Goc, 2011; Tekin et al., 2014), появляются все новые факты, подтверждающие сложность и многоэтапность регуляции экспрессии ключевого фермента синтеза дофамина и норадреналина. К их числу относится проблема механизмов глюкокортикоидной регуляции гена ТГ.

Регуляция экспрессии тирозингидроксилазы глюкокортикоидами

Действие стресса различной природы – холод, иммобилизация, изоляция, гипогликемия и т. д. – повышает уровень мРНК, белка и активность ТГ как в мозге, так и на периферии (Makino et al., 2002; Sabban et al., 2004; Kvetnansky et al., 2009). Однако непосредственное введение гормонов стресса – глюкокортикоидов – вызывает подчас неоднозначные и противоречивые результаты, связанные в основном с периодом воздействия, дозой введенного гормона, исследуемой линией животных.

В культуре клеток феохромоцитомы индукция глюкокортикоидами экспрессии ТГ установлена много лет назад (Lewis et al., 1983) и неоднократно подтверждена в дальнейшем (Tank et al., 1986; Fossum et al., 1992; Hagerty et al., 2001; Radcliffe et al., 2009; Rani et al., 2009). Более того, обработка культуры клеток дексаметазоном была использована при определении нуклеотидной последовательности гена ТГ (Lewis et al., 1983).

Работы ряда исследователей и наши опыты убедительно свидетельствуют о гормональной индукции гена ТГ *in vivo* при введении глюкокортикоидов в раннем онтогенезе у грызунов, а также об участии ТГ мозга в гормон-зависимом «онтогенетическом программировании». После введения глюкокортикоидов в конце пренатального онтогенеза активность фермента в области локализации перикарионов норадренергических нейронов повышается уже через 6 ч и оказывается измененной во взрослом состоянии (Markey et al., 1982; Дыгало, Калинина, 1993; Dent et al., 2001; Калинина, Дыгало, 2013).

Исследования последних лет показали, что повышение активности ТГ в раннем онтогенезе при введении как дексаметазона, так и гидрокортизона сопровождается увеличением мРНК фермента (Kalinina et al., 2012). Было установлено, что период индуцирующего действия глюкокортикоидов у грызунов охватывает конец внутриутробного – начало постнатального развития. Введение гормона

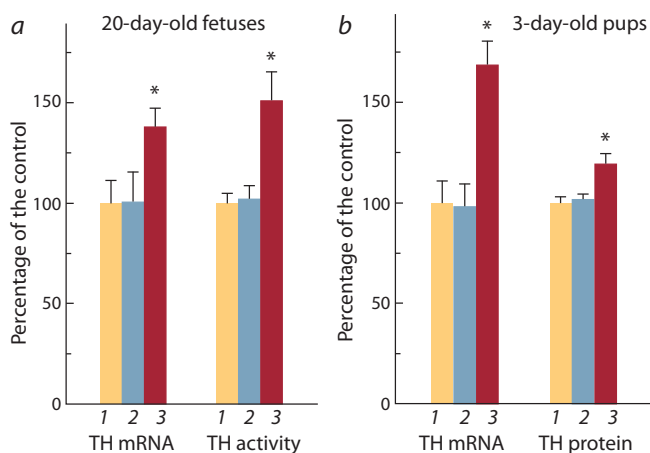


Fig. 1. TH mRNA levels and TH activity/protein levels in the brainstem of (a) rat fetuses and (b) 3-day-old pups 6 hours after dexamethasone treatment.

1, Intact; 2, saline; 3, dexamethasone. * $p < 0.05$ in comparison to control groups.

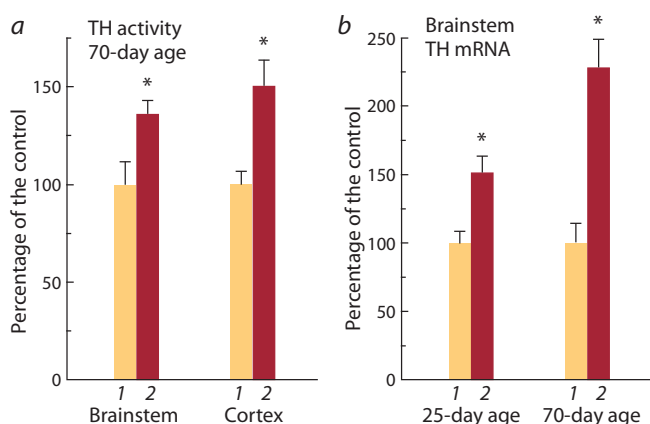


Fig. 2. Long-lasting effects of dexamethasone treatment (a) during pregnancy or (b) on day 3 of life.

a, TH activity in the brainstem and cortex of 70-day-old rats; b, TH mRNA levels in the brainstem of 25- and 70-day-old rats; 1, control; 2, dexamethasone. * $p < 0.05$ in comparison to the control group.

как на 20-й день пренатального онтогенеза (рис. 1, а), так и на 3-й день жизни (рис. 1, б) приводит к увеличению мРНК гена ТГ, а также росту активности или иммуногистохимически выявленного белка фермента через 6 ч после воздействия. Отдаленные последствия введения гормона проявляются как повышенной активностью ТГ в стволе и коре мозга уже взрослых животных (рис. 2, а), так и значительным превышением уровня экспрессии гена в стволе мозга ювенильных и взрослых крыс (рис. 2, б). Следовательно, гормональная индукция в чувствительный период раннего онтогенеза способна на длительный период модифицировать ход развития медиаторной системы и тем самым изменить ее функционирование.

Отсроченные последствия гормонального воздействия распространяются на уровень дофамина и норадреналина, обмен нейротрансмиттеров при стрессе, а также на регулируемые катехоламинами функции и поведение взрослых

животных (Naumenko, Dygalo, 1980; Matthews et al., 2001; Kreider et al., 2006; Slotkin et al., 2006; McArthur et al., 2007; Kapoor et al., 2008; Champagne et al., 2009).

Вместе с тем вопрос о механизме регуляции ТГ глюкокортикоидами остается открытым на протяжении многих лет его исследования. Это связано с отсутствием функционально активного глюкокортикоид-зависимого элемента (GRE) в промоторе гена ТГ, взаимодействие с которым глюкокортикоидных рецепторов является обязательным этапом регуляции экспрессии генов (Oakley, Cidlowski, 2013), согласно каноническому механизму действия стероидных гормонов. Все попытки обнаружить «работающий» GRE в регуляторных областях гена ТГ у грызунов и человека, начавшиеся уже более 30 лет назад (Lewis et al., 1983; Tank et al., 1986; Fossum et al., 1992; Hagerty et al., 2001), не дали положительного результата. Последовательности, сходные с GRE в позициях –454 п. н. и –2,5 тыс. п. н. от старта транскрипции в промоторе ТГ, либо совсем не реагировали на дексаметазон (Lewis et al., 1983), либо их активность не подтвердилась в дальнейшем (Hagerty et al., 2001; Rani et al., 2009). Регуляция глюкокортикоидами экспрессии ТГ в мозге взрослых животных не находит экспериментальных подтверждений (Sabban, Kvetnansky, 2001; Makino et al., 2002; Kvetnansky et al., 2009; Lenartowski, Goc, 2011). Способность гормона индуцировать ТГ в раннем онтогенезе также ограничена определенным временным интервалом – введение глюкокортикоидов на восьмой день жизни не приводило к каким-либо изменениям в уровне мРНК или активности фермента (Kalinina et al., 2012).

Очевидное противоречие между отсутствием GRE и выявленной глюкокортикоидной индукцией экспрессии гена ТГ в ряде моделей (культурах клеток и в определенный период раннего онтогенеза) позволило предположить возможность неканонического пути регуляции гормоном экспрессии фермента. Механизм неканонического действия глюкокортикоидов, предложенный еще в середине 1990-х годов, находит все больше экспериментальных подтверждений (Groeneweg et al., 2012). Согласно этому механизму, регуляция экспрессии генов глюкокортикоидами может осуществляться за счет белок-белкового взаимодействия активированного гормоном рецептора с белками других транскрипционных факторов (Liberman et al., 2007; Beck et al., 2009; Langlais et al., 2012), среди которых наибольший интерес представляет транскрипционный комплекс AP-1 (Diamond et al., 1990; Pfahl, 1993; Teurich, Angel, 1995; Kassel, Herrlich, 2007). Особенность вовлечения AP-1 в регуляцию экспрессии генов состоит в зависимости направления изменения компонентного состава белков, его образующих (Teurich, Angel, 1995). При взаимодействии глюкокортикоидного рецептора с AP-1 комплексом, образованным гетеродимером Fos/Jun, глюкокортикоиды подавляют, а при взаимодействии с гомодимером Jun/Jun, напротив, активируют транскрипцию генов (Teurich, Angel, 1995; Sapolsky et al., 2000; Kassel, Herrlich, 2007; Newton, Holden, 2007).

Промотор гена ТГ содержит два сайта связывания транскрипционного комплекса AP-1 (–207/–201 и –5728/–5734) (рис. 3) (Fung et al., 1992; Rani et al., 2009). Участие дистального AP-1 в глюкокортикоидной индукции

гена ТГ в культуре клеток феохромоцитомы крысы (Rani et al., 2009) и человека (Rani et al., 2013) доказано. Функционирование подобного механизма *in vivo*, в развивающемся мозге, еще предстоит установить. Известная вариабельность экспрессии белков Fos и Jun в ходе развития (Pennypacker, 1995; Zhong et al., 2001; Okada et al., 2003; Raivich, Behrens, 2006), определяющая результат белок-белкового механизма действия гормона, может быть основой зависимости индуцирующих эффектов глюкокортикоидов на ТГ от стадии онтогенеза (Kalinina et al., 2012). В пилотных экспериментах было установлено, что уровень нативной экспрессии генов семейства Jun (*c-jun*, *junB*, *junD*) во много раз выше экспрессии генов Fos (*c-fos*, *fosB*) в чувствительный к уровню гормона период развития (20–21-суточные плоды и трехдневные крысята), чем вне его (восьмидневные животные) (Сухарева и др., 2015). Кроме того, само введение дексаметазона на третий день жизни снижает экспрессию гена *c-fos* в стволе головного мозга, тем самым смещая соотношение белков AP-1 в сторону преобладания белков Jun, необходимого для проявления глюкокортикоидной индукции гена ТГ (Сухарева и др., 2016).

В целом совокупность известных на сегодняшний день данных о регуляции глюкокортикоидами экспрессии ТГ мозга в критический период раннего онтогенеза, представленных в обзоре, свидетельствует о важной роли гена ключевого фермента синтеза норадреналина в процессах «онтогенетического программирования». Исследование на его основе механизма неканонического действия глюкокортикоидов в результате взаимодействия с другими транскрипционными факторами дает исключительную возможность для расширения понимания многообразия уровней регуляции экспрессии нейрогенов факторами внешней среды.

Acknowledgments

This work was supported by the RAS program «Academic Science to Medicine», project 0324-2015-0020, and the Russian Foundation for Basic Research, projects 13-04-01104-a and 16-04-01222-a.

E.V.S. and T.S.K. equally contributed to the manuscript preparation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Altmann C.R., Brivanlou A.H. Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int. Rev. Cytol.* 2001;203:447-482.
- Bademci G., Vance J.M., Wang L. Tyrosine hydroxylase gene: another piece of the genetic puzzle of Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2012;11(4):469-481.
- Barker D.J. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995; 311(6998):171-174.
- Barth K.A., Kishimoto Y., Rohr K.B., Seydler C., Schulte-Merker S., Wilson S.W. Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development.* 1999; 126(22):4977-4987.
- Beck I.M., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Yamamoto K.R., Haegeman G., De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr. Rev.* 2009;30(7):830-882. DOI 10.1210/er.2009-0013

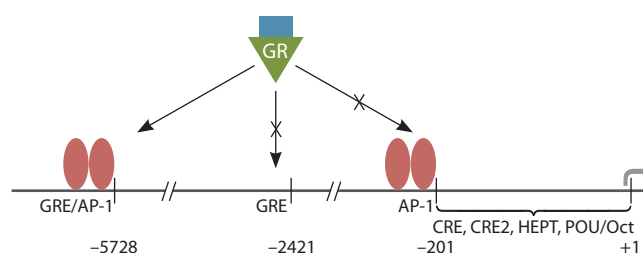


Fig. 3. Schematic presentation of the rat TH promoter and TH gene regulation by glucocorticoids.

● – protein Fos/Jun; ■ – glucocorticoids; ▽ – glucocorticoid receptor.

- Bingham B.C., Sheela Rani C.S., Frazer A., Strong R., Morilak D.A. Exogenous prenatal corticosterone exposure mimics the effects of prenatal stress on adult brain stress response systems and fear extinction behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(11):2746-2757. DOI 10.1016/j.psyneuen.2013.07.003
- Bonnin A., de Miguel R., Rodriguez-Manzanque J.C., Fernandez-Ruiz J.J., Santos A., Ramos J.A. Changes in tyrosine hydroxylase gene expression in mesencephalic catecholaminergic neurons of immature and adult male rats perinatally exposed to cannabinoids. *Brain Res. Develop. Brain Res.* 1994;81(1):147-150.
- Bornstein S.R., Tian H., Haidan A., Böttner A., Hiroi N., Eisenhofer G., McCann S.M., Chrousos G.P., Roffler-Tarlov S. Deletion of tyrosine hydroxylase gene reveals functional interdependence of adrenocortical and chromaffin cell system in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000;97(26):14742-14747. DOI 10.1073/pnas.97.26.14742
- Boschi N.M., Takeuchi K., Sterling C., Tank A.W. Differential expression of polycytosine-binding protein isoforms in adrenal gland, locus coeruleus and midbrain. *Neuroscience.* 2015;286:1-12. DOI 10.1016/j.neuroscience.2014.11.038
- Candy J., Collet C. Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1727(1):35-44.
- Carson R.P., Robertson D. Genetic manipulation of noradrenergic neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002;301(2):410-417.
- Champagne D.L., de Kloet E.R., Joels M. Fundamental aspects of the impact of glucocorticoids on the (immature) brain. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2009;14(3):136-142. DOI 10.1016/j.siny.2008.11.006
- Craig S.P., Buckle V.J., Lamouroux A., Mallet J., Craig I. Localization of the human tyrosine hydroxylase gene to 11p15: gene duplication and evolution of metabolic pathways. *Cytogenet. Cell Genet.* 1986;42(1/2):29-32.
- Dent G.W., Smith M.A., Levine S. Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny. *Brain Res. Develop. Brain Res.* 2001;127(1):23-30.
- Diamond M.I., Miner J.N., Yoshinaga S.K., Yamamoto K.R. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science.* 1990;249(4974):1266-1272.
- Dunkley P.R., Bobrovskaya L., Graham M.E., von Nagy-Felsobuki E.I., Dickson P.W. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J. Neurochem.* 2004;91(5):1025-1043.
- Dygalo N.N., Kalinina T.S. Effects of genotype-glucocorticoid interaction on the tyrosine hydroxylase activity in the brain of rat fetuses. *Genetika = Genetics (Moscow).* 1993;29(9):1453-1459.
- Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Neonatal programming of rat behavior by downregulation of alpha2A-adrenoreceptor gene expression in the brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008;1148:409-414. DOI 10.1196/annals.1410.063
- Fossom L.H., Sterling C.R., Tank A.W. Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate and tyrosine hydroxylase mRNA stability by cyclic AMP and glucocorticoid. *Mol. Pharmacol.* 1992; 42(5):898-908.

- Friggi-Grelín F., Coulom H., Meller M., Gomez D., Hirsh J., Birman S. Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J. Neurobiol.* 2003; 54(4):618-627. DOI 10.1002/neu.10185
- Fujinaga M., Scott J.C. Gene expression of catecholamine synthesizing enzymes and beta adrenoceptor subtypes during rat embryogenesis. *Neurosci. Lett.* 1997;231(2):108-112.
- Fung B.P., Yoon S.O., Chikaraishi D.M. Sequences that direct rat tyrosine-hydroxylase gene-expression. *J. Neurochem.* 1992;58(6): 2044-2052.
- Gallo L.A., Tran M., Moritz K.M., Wlodek M.E. Developmental programming: Variations in early growth and adult disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2013;40(11):795-802. DOI 10.1111/1440-1681.12092
- Goridis C., Rohrer H. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002;3(7):531-541. DOI 10.1038/nrn871
- Groeneweg F.L., Karst H., de Kloet E.R., Joels M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;350(2):299-309. DOI 10.1016/j.mce.2011.06.020
- Guo S., Brush J., Teraoka H., Goddard A., Wilson S.W., Mullins M.C., Rosenthal A. Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein *Soulless/Phox2a*. *Neuron.* 1999;24(3):555-566.
- Hagerty T., Morgan W.W., Elango N., Strong R. Identification of a glucocorticoid-responsive element in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J. Neurochem.* 2001;76(3):825-834.
- Harris A., Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm. Behav.* 2011;59(3):279-289. DOI 10.1016/j.yhbeh.2010.06.007
- Haycock J.W. Species differences in the expression of multiple tyrosine hydroxylase protein isoforms. *J. Neurochem.* 2002;81(5):947-953.
- Hebert M.A., Serova L.I., Sabban E.L. Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus. *J. Neurochem.* 2005;95(2):484-498.
- Herlenius E., Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp. Neurol.* 2004;190:8-21. DOI 10.1016/j.expneurol.2004.03.027
- Hernandez-Sanchez C., Bartulos O., Valenciano A.I., Mansilla A., de Pablo F. The regulated expression of chimeric tyrosine hydroxylase-insulin transcripts during early development. *Nucl. Acids.* 2006; 34(12):3455-3464.
- Hippenmeyer S., Kramer I., Arber S. Control of neuronal phenotype: what targets tell the cell bodies. *Trends Neurosci.* 2004;27(8):482-488. DOI 10.1016/j.tins.2004.05.012
- Hirsch M.R., Tiveron M.C., Guillemot F., Brunet J.F., Goridis C. Control of noradrenergic differentiation and *Phox2a* expression by *MASH1* in the central and peripheral nervous system. *Development.* 1998;125(4):599-608.
- Holm P.C., Rodriguez F.J., Kele J., Castelo-Branco G., Kitajewski J., Arenas E. BMPs, FGF8 and Wnts regulate the differentiation of locus coeruleus noradrenergic neuronal precursors. *J. Neurochem.* 2006;99(1):343-352. DOI 10.1111/j.1471-4159.2006.04039.x
- Kalina T.S., Dygalo N.N. Development of the noradrenergic system of the rat brain after prenatal exposure to corticosterone. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk – Seriya Biologicheskaya=Biological Bulletin of the Russian Academy of Science.* 2013;4:447-452. DOI 10.7868/S0002332913040048
- Kalina T.S., Shishkina G.T., Dygalo N.N. Induction of tyrosine hydroxylase gene expression by glucocorticoids in the perinatal rat brain is age-dependent. *Neurochem. Res.* 2012;37(4):811-818.
- Kapoor A., Petropoulos S., Matthews S.G. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res. Rev.* 2008;57(2):586-595. DOI 10.1016/j.brainresrev.2007.06.013
- Kassel O., Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007;275(1/2):13-29.
- Kobayashi K., Morita S., Sawada H., Mizuguchi T., Yamada K., Nagatsu T., Hata T., Watanabe Y., Fujita K., Nagatsu T. Targeted disruption of the tyrosine-hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(45):27235-27243.
- Kreider M.L., Tate C.A., Cousins M.M., Oliver C.A., Seidler F.J., Slotkin T.A. Lasting effects of developmental dexamethasone treatment on neural cell number and size, synaptic activity, and cell signaling: critical periods of vulnerability, dose-effect relationships, regional targets, and sex selectivity. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(1): 12-35. DOI 10.1038/sj.npp.1300783
- Kumer S.C., Vrana K.E. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J. Neurochem.* 1996;67(2):443-462.
- Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol. Rev.* 2009;89(2):535-606.
- Langlais D., Couture C., Balsalobre A., Drouin J. The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome. *Mol. Cell.* 2012;47(1):38-49. DOI 10.1016/j.molcel.2012.04.021
- Lenartowski R., Goc A. Epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2011;29(8):873-883.
- Lewis E.J., Tank A.W., Weiner N., Chikaraishi D.M. Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. Isolation of a cDNA clone for tyrosine hydroxylase mRNA. *J. Biol. Chem.* 1983;258(23):14632-14637.
- Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F., Arzt E. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *FASEB J.* 2007;21(4):1177-1188. DOI 10.1096/fj.06-7452com
- Lopez-Sanchez C., Bartulos O., Martinez-Campos E., Ganan C., Valenciano A.I., Garcia-Martinez V., De Pablo F., Hernandez-Sanchez C. Tyrosine hydroxylase is expressed during early heart development and is required for cardiac chamber formation. *Cardiovasc. Res.* 2010;88(1):111-120.
- Makino S., Smith M.A., Gold P.W. Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. *Brain Res.* 2002;943(2):216-223.
- Markey K.A., Towle A.C., Sze P.Y. Glucocorticoid influence on tyrosine hydroxylase activity in mouse locus coeruleus during postnatal development. *Endocrinology.* 1982;111(5):1519-1523. DOI 10.1210/endo-111-5-1519
- Markham J.A., Koenig J.I. Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology.* 2011;214(1):89-106. DOI 10.1007/s00213-010-2035-0
- Matthews K., Dalley J.W., Matthews C., Tsai T.H., Robbins T.W. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse.* 2001;40(1):1-10. DOI 10.1002/1098-2396(200104)40:1<1::AID-SYN1020>3.0.CO;2-E
- McArthur S., McHale E., Gillies G.E. The size and distribution of mid-brain dopaminergic populations are permanently altered by perinatal glucocorticoid exposure in a sex- region- and time-specific manner. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32(7):1462-1476. DOI 10.1038/sj.npp.1301277
- Morin X., Cremer H., Hirsch M.R., Kapur R.P., Goridis C., Brunet J.F. Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene *Phox2a*. *Neuron.* 1997;18(3):411-423.
- Nagamoto-Combs K., Piech K.M., Best J.A., Sun B., Tank A.W. Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and AP1 sites following calcium influx. Evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation. *J. Biol. Chem.* 1997;272(9):6051-6058.
- Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1964;2910-2917.

- Naumenko E.V., Dygalo N.N. Noradrenergic brain mechanisms and emotional stress in adult rats after prenatal hydrocortisone treatment. *Biogenic Amines in Development*. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980;373-388.
- Newton R., Holden N.S. Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol. Pharmacol.* 2007;72(4):799-809.
- Oakley R.H., Cidlowski J.A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;132(5):1033-1044. DOI 10.1016/j.jaci.2013.09.007
- Okada Y., Saika S., Shirai K., Ohnishi Y., Senba E. Expression of AP-1 (c-fos/c-jun) in developing mouse corneal epithelium. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2003;241(4):330-333.
- Qian Y., Fritzsche B., Shirasawa S., Chen C.L., Choi Y., Ma Q. Formation of brainstem (nor)adrenergic centers and first-order relay visceral sensory neurons is dependent on homeodomain protein Rnx/Tlx3. *Genes Dev.* 2001;15(19):2533-2545.
- Pattyn A., Goridis C., Brunet J.F. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol. Cell. Neurosci.* 2000;15(3):235-243. DOI 10.1006/mcne.1999.0826
- Paulding W.R., Schnell P.O., Bauer A.L., Striet J.B., Nash J.A., Kuznetsova A.V., Czyzyk-Krzeska M.F. Regulation of gene expression for neurotransmitters during adaptation to hypoxia in oxygen-sensitive neuroendocrine cells. *Microsc. Res. Techniq.* 2002;59(3):178-187. DOI 10.1002/jemt.10192
- Pennypacker K.R. AP-1 transcription factor complexes in CNS disorders and development. *J. Florida Med. Assoc.* 1995;82(8):551-554.
- Pfahl M. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr. Rev.* 1993;14(5):651-658.
- Puymirat J., Faivre-Bauman A., Bizzini B., Tixier-Vidal A. Prenatal and postnatal ontogenesis of neurotransmitter-synthesizing enzymes and [125I]tetanus toxin binding capacity in the mouse hypothalamus. *Brain Res.* 1982;255(2):199-206.
- Radcliffe P.M., Sterling C.R., Tank A.W. Induction of tyrosine hydroxylase mRNA by nicotine in rat midbrain is inhibited by mifepristone. *J. Neurochem.* 2009;109(5):1272-1284. DOI 10.1111/j.1471-4159.2009.06056.x
- Raivich G., Behrens A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Progr. Neurobiol.* 2006;78(6):347-363.
- Rani C.S., Elango N., Wang S.S., Kobayashi K., Strong R. Identification of an activator protein-1-like sequence as the glucocorticoid response element in the rat tyrosine hydroxylase gene. *Mol. Pharmacol.* 2009;75(3):589-598.
- Rani C.S.S., Soto-Pina A., Iacovitti L., Strong R. Evolutionary conservation of an atypical glucocorticoid-responsive element in the human tyrosine hydroxylase gene. *J. Neurochem.* 2013;126(1):19-28. DOI 10.1111/jnc.12294
- Reynolds R.M. Programming effects of glucocorticoids. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2013;56(3):602-609. DOI 10.1097/GRF.0b013e31829939f7
- Rios M., Habecker B., Sasaoka T., Eisenhofer G., Tian H., Landis S., Chikaraishi D., Roffler-Tarlov S. Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *J. Neurosci.* 1999;19(9):3519-3526.
- Romano G., Suon S., Jin H., Donaldson A.E., Iacovitti L. Characterization of five evolutionary conserved regions of the human tyrosine hydroxylase (TH) promoter: implications for the engineering of a human TH minimal promoter assembled in a self-inactivating lentiviral vector system. *J. Cell. Physiol.* 2005;204(2):666-677.
- Sabban E.L., Hebert M.A., Liu X., Nankova B., Serova L. Differential effects of stress on gene transcription factors in catecholaminergic systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004;1032:130-140.
- Sabban E.L., Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci.* 2001;24(2):91-98.
- Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 2000;21(1):55-89.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Attenuation of alpha2A-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood. *Neuroscience*. 2004a;129(3):521-528. DOI 10.1016/j.neuroscience.2004.08.015
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Popova N.K., Dygalo N.N. Influence of neonatal short-term reduction in brainstem alpha2A-adrenergic receptors on receptor ontogenesis, acoustic startle reflex, and prepulse inhibition in rats. *Behav. Neurosci.* 2004b;118(6):1285-1292. DOI 10.1037/0735-7044.118.6.1285
- Simon H.H., Scholz C., O'Leary D.D. Engrailed genes control developmental fate of serotonergic and noradrenergic neurons in mid- and hindbrain in a gene dose-dependent manner. *Mol. Cell. Neurosci.* 2005;28(1):96-105. DOI 10.1016/j.mcn.2004.08.016
- Slotkin T.A., Kreider M.L., Tate C.A., Seidler F.J. Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(5):904-911. DOI 10.1038/sj.npp.1300892
- Sukhareva E.V., Dygalo N.N., Kalinina T.S. Influence of dexamethasone on the expression of immediate-early c-fos and c-jun genes in different regions of the neonatal brain. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*. 2016;50(2):266-271.
- Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Lanshakov D.A., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Proteins of the AP1 complex in glucocorticoid induction of brain tyrosine hydroxylase in early ontogenesis. *Materialy sedmoy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Fundamentalnye aspekty kompensatorno-prisposobitel'nykh protsessov» i Molodezhnogo simpoziuma «Molekulyarno-kletochnye i mediko-ekologicheskie problemy kompensatsii i prisposobleniya»* [Proc. 7th All-Russian Scientific-Practical Conf. "The fundamental aspects of compensatory and adaptive processes" and the Youth Symp. "Molecular and medicoenvironmental problems of compensation and adaptation"]. Novosibirsk, 2015;271-272.
- Sun B., Chen X., Xu L., Sterling C., Tank A.W. Chronic nicotine treatment leads to induction of tyrosine hydroxylase in locus ceruleus neurons: the role of transcriptional activation. *Mol. Pharmacol.* 2004;66(4):1011-1021.
- Tank A.W., Curella P., Ham L. Induction of mRNA for tyrosine hydroxylase by cyclic AMP and glucocorticoids in a rat pheochromocytoma cell line: evidence for the regulation of tyrosine hydroxylase synthesis by multiple mechanisms in cells exposed to elevated levels of both inducing agents. *Mol. Pharmacol.* 1986;30(5):497-503.
- Tank A.W., Xu L., Chen X., Radcliffe P., Sterling C.R. Post-transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase expression in adrenal medulla and brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008;1148:238-248.
- Tekin I., Roskoski R. Jr., Carkaci-Salli N., Vrana K.E. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J. Neur. Transm. (Vienna)*. 2014;121(12):1451-1481. DOI 10.1007/s00702-014-1238-7
- Teurich S., Angel P. The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chem. Sens.* 1995;20(2):251-255.
- Thomas S.A., Matsumoto A.M., Palmiter R.D. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature*. 1995;374(6523):643-646.
- Vogel-Höpkner A., Rohrer H. The specification of noradrenergic locus coeruleus (LC) neurones depends on bone morphogenetic proteins (BMPs). *Development*. 2002;129(4):983-991.
- Wurst W., Bally-Cuif L. Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001;2(2):99-108. DOI 10.1038/35053516
- Yamamoto K., Ruuskanen J.O., Wullimann M.F., Vernier P. Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 2010;43(4):394-402.
- Zhong S., Quealy J.A., Bode A.M., Nomura M., Kaji A., Ma W.Y., Dong Z. Organ-specific activation of activator protein-1 in transgenic mice by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate with different administration methods. *Cancer Res.* 2001;61(10):4084-4091.
- Zhou Q.Y., Quaife C.J., Palmiter R.D. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature*. 1995;374(6523):640-643.

Окситоцин: коэволюция человека и domesticiрованных животных

Ю.Э. Гербек¹✉, Р.Г. Гулевич¹, Д.В. Шепелева¹, В.В. Гриневиц²✉

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

² Группа по изучению нейропептидов им. Шаллера, Немецкий центр исследований рака, Центральный институт психического здоровья, Гейдельбергский университет, Гейдельберг, Маннгейм, Германия

Нейропептид окситоцин (ОТ) и его гомологи синтезируются специализированными нейронами, сосредоточенными у позвоночных животных в эволюционно-древнем отделе головного мозга – гипоталамусе. Аксоны ОТ нейронов следуют в нейрогипофиз, откуда ОТ выделяется в общий кровоток. Наряду с этим коллатерали аксонов ОТ нейронов, как показано у млекопитающих, следуют в различные отделы переднего мозга, в которых ОТ модулирует активность локальных нейронных цепей. На поведенческом уровне ОТ облегчает внутривидовые социальные контакты у млекопитающих, используя широкую палитру механизмов: от подавления активности нейроэндокринной оси стресса до прямого действия на нейроны структур мозга, участвующих в контроле социального поведения. Работы последних лет продемонстрировали участие ОТ в формировании социальных связей между одомашненными животными (собаки, овцы, коровы) и человеком. Они указывают на связь повышенной концентрации эндогенного окситоцина в периферическом кровотоке (и других жидкостях организма, в том числе слюне и моче) и проявлений коммуникативного поведения у животных по отношению к человеку и между собой. Описано, что у домашних животных периферический уровень ОТ коррелирует с частотой контактов с человеком и внутривидовым социальным поведением. Кроме того, в литературе приводятся эксперименты с интраназальным введением ОТ собакам, что, как и при высоком уровне эндогенного ОТ, приводит к повышению частоты контактов с хозяином. Известно, что одомашненные животные характеризуются выраженным социально-коммуникативным поведением, сниженными агрессией и стресс-ответом. Поэтому в данном кратком обзоре мы также затрагиваем вопросы роли ОТ в регуляции различных форм социального поведения: от моногамных отношений до материнского поведения и социального распознавания у людей и животных, а также касаемся значения ОТ в модуляции агрессивного поведения и снижении стресс-реакции и тревожности. При систематизации накопленных данных предложены новые возможности изучения роли ОТ в коммуникативных контактах между одомашненным животным и человеком, сформировавшихся в процессе совместной эволюции на протяжении последних 10–15 тыс. лет.

Ключевые слова: окситоцин; эволюция; domestикация; серебристо-черная лисица; собака; волк; человек и животные.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гербек Ю.Э., Гулевич Р.Г., Шепелева Д.В., Гриневиц В.В. Окситоцин: коэволюция человека и domesticiрованных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):220-227. DOI 10.18699/VJ16.145

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Herbeck Yu.E., Gulevich R.G., Shepeleva D.V., Grinevich V.V. Oxytocin: co-evolution of human and domesticated animals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):220-227. DOI 10.18699/VJ16.145

REVIEW

Received 11.01.2016 г.

Accepted for publication 08.02.2016 г.

© AUTHORS, 2016

Oxytocin: co-evolution of human and domesticated animals

Yu.E. Herbeck¹✉, R.G. Gulevich¹, D.V. Shepeleva¹, V.V. Grinevich²✉

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

² Schaller Research Group on Neuropeptides, German Cancer Research Center, Central Institute of Mental Health and University of Heidelberg, Heidelberg, Mannheim, Germany

The neuropeptide oxytocin (OT) and its homologues are produced in specialized neurons located in Vertebrates exclusively in a deep and evolutionarily old part of the forebrain, the hypothalamus. The axons of OT neurons form the classical hypothalamic-neurohypophyseal tract terminating on blood vessels of the neurohypophysis to release OT into the systemic blood circulation. However, as was recently demonstrated in mammals, collaterals of OT axons concomitantly project to various forebrain regions to modulate the activity of local networks. At the behavioral level, OT facilitates intraspecific social contacts in mammals via various mechanisms ranging from the suppression of neuroendocrine stress responses to the direct OT action on neurons of socially relevant brain regions. Recent reports indicated possible contribution of OT to the formation of the social bond between domesticated mammals (dog, sheep, cattle) and humans. Indeed, social interaction between humans and a domesticated animal resulted in the elevation of peripheral OT levels (in blood, saliva or urine) and, in congruence, exogenous (intranasal) OT application led to more frequent contacts between the owner and the domesticated animal. It has been known for decades that domesticated animals exhibit profound socio-communicative abilities accompanied by suppressed aggression and stress responsiveness. These peculiarities of their behavior and physiology may be influenced by the activity of the central OT system. Therefore, in the present mini-review we focus on the role of OT in the orchestration of distinct forms of social behavior, including the monogamous bond, maternal care, social memory and recognition, aggression, and anxiety. As a conclusion, we propose possible directions for exploration of the OT contribution to empathy between humans and domesticated animals, which was likely established in the course of their co-evolution during last 10,000–15,000 years.

Key words: oxytocin; evolution; domestication; silver fox; dog; wolf; human-animal bond.

...собаки, выражая свою привязанность, любят тереться около хозяина и довольны, когда он ласкает и гладит их, так как вследствие ухаживания за собственными щенятами прикосновение к любимому предмету неразрывно ассоциировалось в их уме с ощущением привязанности.

Ч. Дарвин. О выражении ощущений
у человека и животных

Гипоталамический нейропептид окситоцин (ОТ) – молекула десятилетия – в настоящее время привлекает внимание как специалистов в области нейробиологии, так и широкой общественности. Этот интерес вызван его положительным эффектом на социальное поведение у различных видов позвоночных и человека.

Задолго до того как du Vigneaud с коллегами в 1954 г. синтезировали окситоцин (du Vigneaud et al., 1954) (Нобелевская премия по химии 1955 г.), немецкий анатом Ernst Scharer открыл гигантские клетки в гипоталамусе у костистых рыб, позднее названные магнотеллюлярными нейронами (Scharer, 1928). Эти нейроны были найдены у представителей всех классов позвоночных и, как было показано, продуцируют окситоцин и вазопрессин, а также их гомологи (Knobloch, Grinevich, 2014; Grinevich et al., 2015, 2016). В качестве нейроэндокринного фактора окситоцин поступает в заднюю долю гипофиза, а затем в кровь и оказывает влияние на периферические мишени, контролируя обратный захват натрия в почках и модулируя активность автономной нервной системы, метаболические процессы, ноцицепцию, обезболивание и иммунный ответ (Grinevich et al., 2015, 2016; Eliava et al., 2016). Окситоцин играет важную роль в процессе родов и лактации у млекопитающих, метании икры у рыб и амфибий, откладывании яиц у рептилий и птиц. Несмотря на сходство химической структуры окситоцина и его гомологов, пути транспорта окситоцина в мозге существенно изменялись в ходе эволюции. В то время как у низших позвоночных (рыбы и амфибии) гомологи окситоцина преимущественно выделяются непосредственно в спинномозговую жидкость, у более эволюционно продвинутых позвоночных нейропептид высвобождается в различных отделах переднего мозга, ствола и спинного мозга (так называемое выделение ОТ из терминалей аксонов) (Knobloch, Grinevich, 2014). Важно отметить, что параллельно с изменением в механизмах высвобождения окситоцина в мозге экспрессия рецепторов окситоцина так же широко изменяется в зависимости от специализации отдельных структур мозга, в большой степени соответствуя аксональному транспорту окситоцина (Grinevich et al., 2015, 2016). Этот эволюционно выработанный механизм позволяет по-новому взглянуть на организацию центральной окситоцин-эргической системы, которая имеет большое сходство с другими нейромодуляторными системами мозга, в частности с дофаминовой и серотониновой. Действительно, выделение ОТ из терминалей аксонов в разных структурах головного мозга позволяет определить различное влияние окситоцина на регуляцию специфических типов поведения, контролирующихся определенными участками мозга.

Эволюция коммуникативного поведения и его регуляция окситоцином

Моногамные отношения, родительское и социальное поведение

Исследования разных видов млекопитающих, в большей степени грызунов и человека, выявили ряд форм социального поведения, в регуляции которых участвуют ОТ и его рецептор. У некоторых рыб, земноводных, пресмыкающихся и птиц также показана роль гомологов ОТ в социальном поведении (см. Knobloch, Grinevich, 2014). Так, изотоксин, введенный в преоптическую область переднего гипоталамуса, усиливает социальную вокализацию у рыбы-мичмана (*Porichthys notatus*) (Goodson, Bass, 2000). У крыс и мышей показано участие ОТ в социальном распознавании и памяти, куда входит способность отличить знакомую особь от незнакомой. Этот вид поведения является важным фактором формирования социальной структуры популяции и влияет на уровень социальной агрессии (Бондарь, Кудрявцева, 2005). Одним из способов оценки социальной памяти является определение времени, проведенного рядом с другим животным. Рядом со знакомой особью животное проводит меньше времени (Ross, Young, 2009). Показано, что введение окситоцина в различные структуры мозга крысы (включая латеральный желудочек, гиппокамп, медиальную преоптическую область или обонятельные луковицы) снижает время, проведенное около знакомой особи, тогда как введение антагониста окситоцина, наоборот, существенно снижает социальную память (Popik et al., 1992; Benelli et al., 1995; Ross, Young, 2009). Изучение линий мышей, нокаутных по генам ОТ или ОТ рецептора, показало их сниженную способность к социальному распознаванию. Эти мыши не запоминали социальные запаховые сигналы, однако нарушение в системе ОТ не влияло на их способность запоминать и распознавать несоциальные запахи (Ferguson et al., 2001). Введение ОТ в медиальное ядро миндалины восстанавливало способность мышей к социальному распознаванию.

Социальные эффекты ОТ также были хорошо изучены в серии экспериментов на желтобрюхих полевках (*Microtus ochrogaster*). У особей данного вида, характеризующихся моногамностью, уровень экспрессии ОТ рецептора в мозге коррелирует со степенью предпочтения к половому партнеру (Ross, Young, 2009). Более того, введение ОТ или аденоассоциированного вирусного вектора, содержащего ДНК ОТ рецептора, в желудочек мозга самок способствовало формированию устойчивых пар и повышало количество социальных контактов (Cho et al., 1999). Напротив, введение антагониста ОТ в префронтальную

кору, прилежащее ядро (*nucleus accumbens*) или антагониста ОТ рецептора в боковой желудочек мозга снижало у самок предпочтение к партнеру без значительного снижения количества спариваний (Insel, Hulihan, 1995; Young et al., 2001; Ross, Young, 2009). Поэтому неудивительно, что при сравнении мозга двух видов полевок – моногамной желтобрюхой (*Microtus ochrogaster*) и полигамной горной (*Microtus montanus*) – большее количество ОТ рецептора было обнаружено у моногамного вида в прилежащем ядре и вентральном стриатуме (Young et al., 2001).

Широко известно, что ОТ играет ключевую роль в инициации родов, кормлении и материнском поведении млекопитающих (Francis et al., 2000; Ross, Young, 2009). Кроме того, ОТ участвует в регуляции коммуникативного поведения по отношению к новорожденным детенышам у нерожавших самок полевок: 50 % самок желтобрюхой полевки проявляют «спонтанную» материнскую заботу (Olazábal, Young, 2005), причем, показано, что у таких самок повышено количество ОТ рецептора в прилежащем и хвостом ядрах мозга, а введение антагониста ОТ в прилежащее ядро ингибирует «спонтанное» материнское поведение (Olazábal, Young, 2006). Таким образом, рассматривая социальное поведение по отношению как к половому партнеру, так и новорожденным детенышам, логично заключить, что у самок моногамных полевок ОТ играет определяющую роль в коммуникативном поведении.

Окситоцин и снижение агрессии

Помимо участия в коммуникативном поведении, ОТ связан с регуляцией разных форм агрессивного поведения (Bosch, Neumann, 2012; Calcagnoli et al., 2013, 2014). Исследования на самцах крыс Groningen 35-го поколения разведения в неволе, имеющих довольно большой разброс межсамцовой агрессии, выявили обратную зависимость между уровнем агрессии и количеством мРНК ОТ в паравентрикулярном ядре гипоталамуса, а введение ОТ в желудочек мозга вызывало дозозависимое понижение агрессивности этих крыс, причем ярче эффект проявлялся у более агрессивных крыс (Calcagnoli et al., 2013, 2014). В ранних исследованиях не было показано такого четкого эффекта ОТ, скорее всего, из-за более низкого уровня агрессивности у большинства лабораторных линий по сравнению с крысами Groningen (de Boer et al., 2003). С другой стороны, в ряде исследований, в особенности на человеке, показана индивидуальность эффектов ОТ, которая зависит от ситуации, физиологических и генетических особенностей организма (Bartz et al., 2011; Olff et al., 2013). Однако следует подчеркнуть, что оценка количества рецептора ОТ в мозге крыс Groninger, в противоположность самому ОТ, выявила прямую взаимосвязь между уровнем агрессии и количеством рецептора в центральной миндалине и опорном ядре терминального тяжа (*Bed nucleus of stria terminalis*). Вероятно, именно большее количество рецептора ОТ и является причиной более яркого эффекта от введения ОТ в желудочек мозга у наиболее агрессивных крыс (Calcagnoli et al., 2014).

Несколько иная картина наблюдается при агрессии у самок крыс. В конце подросткового периода развития агрессия, направленная на самку того же возраста, со-

впадает с пониженной активацией ОТ нейронов в паравентрикулярном ядре (de Jong et al., 2014). При этом, как и у самцов, введение ОТ в латеральный желудочек мозга также приводило к снижению агрессии, однако эффекта не наблюдалось у крыс линии НАВ, характеризующихся повышенной тревожностью и агрессией (de Jong et al., 2014). В противоположность этому, материнские агрессия и забота, по-видимому, связаны с повышенным количеством ОТ в мозге, а именно в таких структурах, как центральная миндалина, паравентрикулярное ядро гипоталамуса, опорное ядро терминального тяжа, хотя эффекты ОТ во многом зависят от генотипа животных (Bosch, Neumann, 2012).

Окситоцин, нейроэндокринная гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система и тревожность

В течение последних 20 лет (см. Neumann, 2008) было многократно показано, что ОТ подавляет реакцию гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС) в ответ на разные виды стресса как при его центральном введении у животных (Windle et al., 2004), так и после интраназального применения у людей (Meinlschmidt, Heim, 2007). В обоих случаях происходило снижение уровней кортикостерона (грызуны), кортизола (приматы) и АКТГ, зависящих от вводимой концентрации ОТ. Основными мишенями ОТ являются центральные нейроны ГГАС, синтезирующие кортиколиберин (Jurek et al., 2015). Однако эти нейроны не содержат ОТ рецепторов и действие ОТ, скорее всего, опосредовано гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК) (Bülbül et al., 2011).

Наряду с нейроэндокринным эффектом ОТ на ГГАС этот нейропептид оказывает мощное анксиолитическое действие (Neumann, Landgraf, 2012), опосредованное его действием на ГАМК-эргические нейроны центрального ядра миндалины (Huber et al., 2005; Viviani et al., 2011), что также подтверждается данными функциональной магнитно-резонансной томографии после интраназального введения ОТ (Kirsch et al., 2005; Domes et al., 2007).

Окситоцин и коэволюция взаимоотношений человека и животных

Эволюция современного человека связана с одомашниванием (или domestикацией) животных, поскольку в процессе одомашнивания человек создал для себя новую среду, значительно повлиявшую на все стороны его жизни. Таким образом, процесс развивался в двух направлениях: человек положил начало одомашниванию животных, а domestикация стала одним из важнейших факторов формирования социальной структуры человеческого общества (Price, 2002). Схожи даже социальные сигналы, такие как обмен взглядами, позы или мимика, не только в общении между человеком и животными, но и во время внутривидовых межличностных контактов (Kujala et al., 2012; Palagi et al., 2015). Отсутствие агрессии к человеку у домашних животных связывают со снижением стресс-активности при domestикации (Belyaev, 1979; Беляев, 1981; Трут и др., 2004; Trut et al., 2004; Jensen, 2014). Доместцированные животные не только не проявляют агрессию, но испытывают положительные эмоции при

встрече с хозяином. Механизмы формирования подобного поведения могут быть связаны с ОТ, который, с одной стороны, подавляет активность ГГАС (Neumann, 2008), а с другой – в ряде случаев способствует социальному и коммуникативному поведению (Ross, Young, 2009).

В исследованиях последних лет было показано, что три одонуклеотидных полиморфизма (ОНП) в промоторе гена ОТ рецептора собаки ассоциированы с реакцией на человека. ОНП 212A/G связан со степенью желания собаки взаимодействовать как с незнакомцем, так и с хозяином (собаки-носители аллеля G менее склонны к взаимодействию) (Kis et al., 2014). ОНП 19131A/G и rs8679684 ассоциированы с уровнем проявления дружелюбного поведения собак в ответ на пассивное, а также угрожающее поведение незнакомца. Однако в данном случае, в отличие от 212A/G, у двух разных пород собак одни и те же аллели были связаны с проявлением противоположных типов поведения.

Важным отличием одомашнированных животных, в особенности собак, от других животных является хорошее распознавание некоторых коммуникативных сигналов, которые использует человек: собака находит по жестам или направлению взгляда человека спрятанную еду и делает это значительно лучше, чем шимпанзе и прирученные волки (Hare et al., 2012). Другим социальным сигналом, которым пользуются собаки при коммуникации с человеком, является обмен взглядами, чего не наблюдается у прирученных волков (Miklósi et al., 2003; Nagasawa et al., 2015). Основываясь на описанных выше особенностях собак, можно предположить, что эволюционное возникновение схожих коммуникативных сигналов человека и одомашнированных животных происходило из-за одинаковой направленности естественного отбора в процессе антропогенеза и искусственного – при исторической одомашнивания (Briine, 2007; Trut et al., 2009; Hare et al., 2012). По-видимому, естественный отбор по поведению при эволюционном становлении человека был направлен на снижение агрессивности, что привело к возникновению целого комплекса физиологических и морфологических признаков, схожих у человека и одомашнированных животных (Briine, 2007; Hare et al., 2012).

В недавних исследованиях было показано, что обмен взглядами между собакой и ее хозяином, связанный с положительным эмоциональным состоянием, вызывает повышение концентрации ОТ в моче как у собаки, так и ее хозяина (Nagasawa et al., 2015). Однако по этим показателям следует очень осторожно судить об активности ОТ системы в мозге, поскольку выделение ОТ в кровь (а отсюда в слюну или мочу) не всегда коррелирует с локальным выделением ОТ из аксональных терминалей в различных областях головного мозга (Knobloch et al., 2012; Grinevich et al., 2015, 2016). Соответственно, в экспериментах на человеке введение ОТ (обычно в виде спрея в нос) стимулирует обмен взглядами, улучшает память на лица и потенцирует социальный эмоциональный ответ (Bartz et al., 2011). Аналогичный эффект ОТ вызывает и у собак: после интраназальной аппликации ОТ повышается продолжительность обмена взглядами с хозяином (1), что приводит к повышению концентрации окситоцина в моче хозяина (Nagasawa et al., 2015); улучшается распознава-

ние жестов, указывающих место нахождения спрятанной пищи (2) (Oliva et al., 2015), и повышается количество контактов с хозяином и другими собаками (3) (Romero et al., 2014). Интересный результат показал эксперимент, в котором определенное местоположение миски соответствовало наличию или отсутствию корма: если миска располагалась между привычными объектами, то к выводу, что в ней есть корм, были более склонны собаки, которым предварительно вводили окситоцин (Kis et al., 2015). Эффект был особенно ярко выражен, если около миски стоял человек. Вероятно, эффект ОТ был связан с подавлением стресса и тревожности в условиях социального контекста (т.е. повышения количества взглядов в глаза человеку, восприятие вербальных сигналов), что могло снижать напряженность и вызывать положительные эмоции (Kis et al., 2015).

Просоциальные эффекты ОТ были отмечены не только у собак: ягнята проявляют привязанность к человеку, ухаживающему за ними, схожую с привязанностью к матери (Nowak, Boivin, 2015). Удивительно, что у ягнят концентрация ОТ в крови повышалась как при сосании молока матери, так и при контакте с человеком. Более того, присутствие человека вызывает у ягнят повышение активности ОТ нейронов и ряда структур мозга, ими иннервируемых (как обнаружено у крыс) и участвующих в возникновении эмоций и социальном распознавании (Nowak, Boivin, 2015). Вероятно, эволюционное происхождение одомашнированного поведения может восходить к взаимоотношениям матери и детеныша, что отмечал еще Ч. Дарвин (Darwin, 1872), и эмпатия человека, направленная на домашних животных, могла возникнуть при генетической и культурной коэволюции (Bradshaw, Paul, 2010). На ранних этапах развития человека способность ухаживать за детенышами животных, возможно, была выбрана в качестве показателя уровня будущей материнской заботы для девочек-подростков. Кроме того, формирование эмпатии, направленной на животных, могло дать группам и эволюционное преимущество в охоте и приручении животных (Bradshaw, Paul, 2010).

Важным для изучения социального поведения, характерного для человека и одомашнированных животных, является сравнение полиморфизма гена рецептора ОТ у человека, бонобо и шимпанзе (Staes et al., 2014). Отбор на снижение агрессии, по-видимому, играл существенную роль в эволюции человека и бонобо, что не происходило в эволюции шимпанзе (Briine, 2007; Hare et al., 2012). Известно, что ОНП rs53576 (A/G) ассоциирован с социальным поведением человека (Rodrigues et al., 2009; Lucht et al., 2009). Носители аллеля A чаще, чем индивидуумы с генотипом GG, характеризуются сниженным уровнем эмпатии и просоциального поведения. Хотя у исследованных шимпанзе и бонобо аллелей A обнаружено не было, у шимпанзе в том же регионе были идентифицированы другие ОНП, которые могут являться функциональными (Staes et al., 2014). Отсутствие полиморфизма в исследованном районе гена рецептора ОТ бонобо может быть связано с гораздо более выраженной эмпатией, чем у шимпанзе и человека. Однако следует подчеркнуть, что шимпанзе, несмотря на известную внутривидовую агрессию, способны проявлять эмпатию

к соплеменникам (de Waal, 2008). Более того, обнаружено повышение концентрации ОТ в моче шимпанзе, если она поделилась пищей со знакомой или незнакомой особью (Wittig et al., 2014).

Перспективы

Окситоцин и социальное поведение у domesticiрованных животных

Основы социального поведения domesticiрованных животных до сих пор во многом неясны (см. Price, 2002; Trut et al., 2009). Однако исследования ОТ системы у домашних животных, которые активно проводятся в последние годы, позволяют по-новому взглянуть на данную проблему, хотя следует признать несколько ограничений, которые необходимо учитывать при интерпретации полученных данных. Во-первых, эффект ОТ как у животных, так и у человека индивидуален и зависит от многих факторов, таких как эндогенный уровень ОТ (Bartz et al., 2011; Romero et al., 2014) и гендер-зависимый эффект (Bosch, Neumann, 2012; Rilling et al., 2014; Nagasawa et al., 2015; Oliva et al., 2015). Во-вторых, ОТ может иметь просоциальный эффект, направленный на знакомых индивидуумов, и антисоциальный – на незнакомых (Shamay-Tsoory et al., 2009; de Dreu et al., 2011). При этом может наблюдаться и третий вариант поведения: после интраназального введения ОТ собаки менее дружелюбно ведут себя в ответ на угрожающее поведение хозяина и в то же время могут чаще обмениваться взглядом с незнакомым экспериментатором или хозяином, ведущим себя нейтрально (Hernádi et al., 2015). Примечательно, что у телок с высоким уровнем ОТ было повышено число как коммуникативных, так и, наоборот, агрессивных взаимодействий между собой (Yayou et al., 2015).

Моделирование эволюционных преобразований поведения при domestикации

В исследовании роли окситоцина при domestикации существенной проблемой является то, что в экспериментах в основном используются собаки. Они прошли путь породообразования, что наложило существенный отпечаток на их поведение. Кроме того, при сравнении собаки с волком, как в исследовании Nagasawa et al., 2015, следует учитывать, что сравнение проводится с современным волком, который прошел свой путь эволюции, хоть и без столь резких преобразований. Результаты исследования уровня окситоцина у прирученных волков (Nagasawa et al., 2015) вызывают сложности в интерпретации, так как ранние постнатальные воздействия (например, хэндлинг) могут оказывать влияние на количество окситоцина (Alves et al., 2015). Решением указанных проблем может стать использование экспериментальной модели domestикации на серебристо-черной лисице, полученной путем многолетней селекции по поведению на толерантную, а затем эмоционально-положительную реакцию по отношению к человеку (Belyaev, 1979; Беляев, 1981; Трут и др., 2004; Trut et al., 2004, 2009). Преимущество данной модели состоит в том, что она позволяет проводить сравнительный анализ животных этих модельных популяций с животными исходных популяций, живущими в тот же

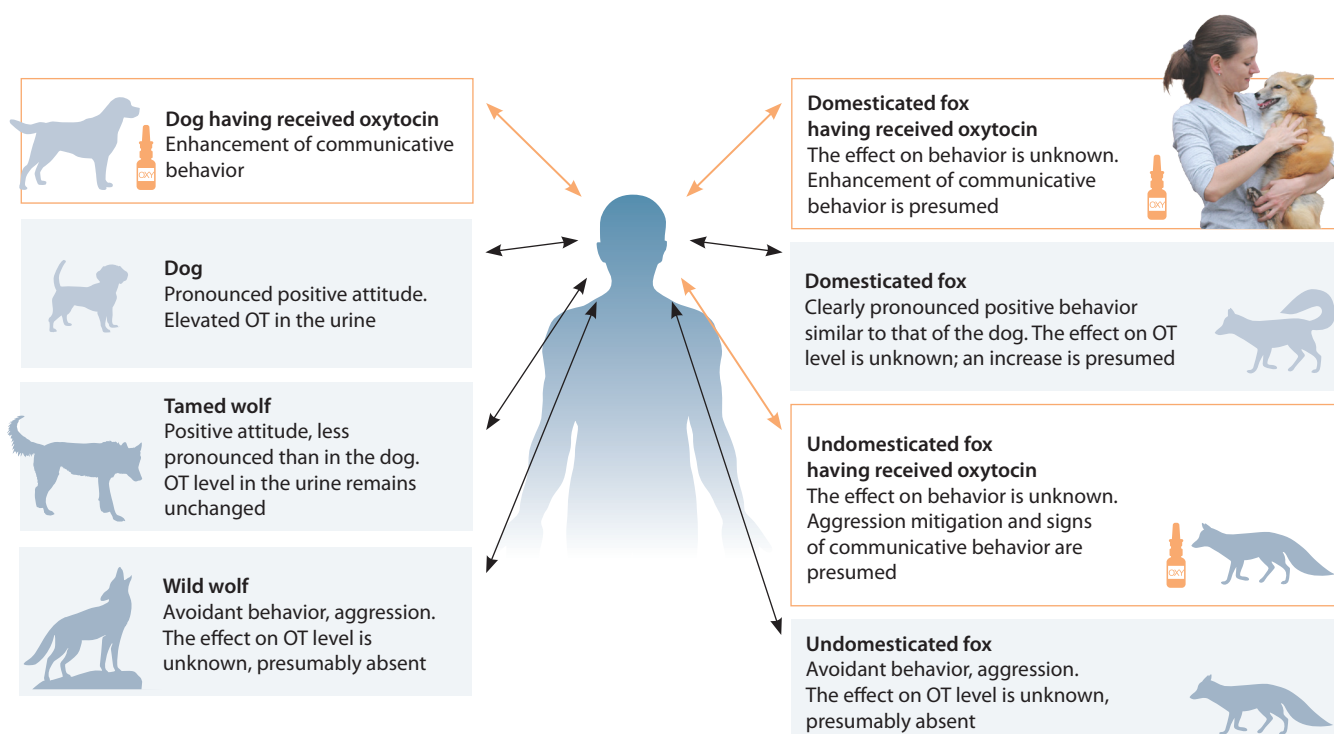
период и в тех же условиях, а также исключить влияние вторичного отбора при породообразовании. Контакт лисиц с человеком при содержании минимален и исключает эффект неонатального хэндлинга.

Доместицируемые лисицы обладают рядом признаков, которые могут быть ассоциированы с активностью ОТ системы. Это и эмоционально-положительное отношение к присутствию человека, проявляющееся в следующем. При приближении экспериментатора (как знакомого, так и незнакомого) domesticiруемые лисицы смотрят в сторону человека, стремятся к нему, покорно прижимают уши, виляют хвостом, скулят, издают шумные звуки при частом поверхностном дыхании, скребут лапами клетку и миску, привлекая внимание человека, прижимаются к стенке клетки вблизи человека. При движении руки по клетке лисицы «играют», следуя за ней, а при тактильном контакте предлагая чесать туловище и голову, переворачиваются на спину, позволяя чесать живот, выражая доверие к человеку. Социализированные лисицы, которые жили с экспериментаторами, как и собаки, выражали больше позитивных реакций по отношению к знакомому человеку, стремились лизать ему руки и лицо (Belyaev, 1979; Беляев, 1981). Поэтому по аналогии с собаками, приближение к которым знакомого человека, а также вербальный и физический контакт вызывают повышение ОТ в крови (Rehn et al., 2014), можно ожидать подобное повышение и у domesticiруемых лисиц.

Обычно процесс domestикации связывают со снижением стресс-реактивности у диких животных, что позволяет им не воспринимать человека как стресс-агента (Belyaev, 1979; Беляев, 1981; Трут и др., 2004; Trut et al., 2004, 2009; Jensen, 2014). Доместицируемые лисицы также отличаются существенным снижением стресс-реактивности и активности ГГАС во всех ее звеньях (Трут и др., 2004; Trut et al., 2004, 2009). Эти различия также могут быть связаны с центральным ингибирующим эффектом ОТ (Windle et al., 2004).

Существенным отличием domesticiрованных животных от диких, как указывалось выше, является хорошее распознавание социальных сигналов человека, и ОТ играет важную роль в этом процессе, что должно распространяться и на лисиц, так как щенки domesticiруемых лисиц распознают указательные жесты человека так же, как щенки собак, и лучше, чем щенки неселекционированных лисиц (Hare et al., 2005). Это позволяет предполагать, что способность у domesticiрованных животных к распознаванию коммуникативных сигналов человека имеет генетическую компоненту, а также что ее возникновение в процессе domestикации может быть связано с изменением систем, формирующих агрессивное, толерантное или эмоционально-положительное поведение (Hare et al., 2012), т. е. систем, среди которых центральное место занимает ОТ.

Для исследования роли ОТ системы в domestикации серебристо-черных лисиц нам представляется важным провести сравнительный иммуно-гистохимический анализ ОТ в мозге domesticiруемых и недоместицируемых лисиц, а также автораддиографию его рецептора. Кроме того, учитывая работы последних лет по социальному поведению domesticiрованных животных и человека (Romero



Interaction with humans induces a positive emotional response and an increase in the level of peripheral oxytocin levels in domesticated animals. Intranasal oxytocin preadministration enhances the communicative behavior in domesticated foxes.

We anticipate that chronic oxytocin administration will enhance the manifestation of communicative behavior in domesticated foxes, whereas in nondomesticated foxes oxytocin will suppress aggression and, possibly, encourage a communicative response to humans.

OT, oxytocin; $\longleftrightarrow$ Contact between a human and an animal; $\longleftrightarrow$ Contact between a human and an oxytocin-treated animal.

et al., 2014; Nagasawa et al., 2015; Oliva et al., 2015), имеет смысл сравнить периферическую концентрацию окситоцина у domesticируемых и domesticируемых лисиц. Поскольку интраназальное введение ОТ domesticируемым лисицам может не дать желаемого результата из-за более высокой стрессуемости этих лисиц по сравнению с domesticируемыми, более предпочтительным является активация или подавление ОТ нейронов с применением вирусных и фармакогенетических технологий (Grinevich et al., 2016; Somatic transgenesis..., 2016, в печати). Несмотря на трудоемкость, сравнительные исследования domesticируемых и domesticируемых лисиц внесут существенный вклад в исследование роли ОТ в процессе domesticации (рисунок).

Acknowledgments

Yu.E.G., R.G.G. and D.V.Sh. acknowledge the support by State Contract 0324-2015-0012 and the Russian Foundation of Basic Research, project 16-04-00637. V.V.G. acknowledges the support by the Chica and Heinz Schaller Research Foundation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Alves E., Fielder A., Ghabriel N., Sawyer M., Buisman-Pijlman F.T.A. Early social environment affects the endogenous oxytocin system: a review and future directions. *Front. Endocrinol.* 2015;6:32. DOI 10.3389/fendo.2015.00032

Bartz J.A., Zaki J., Bolger N., Ochsner K.N. Social effects of oxytocin in humans: context and person matter. *Trends Cogn. Sci.* 2011;15: 301-309. DOI 10.1016/j.tics.2011.05.002

Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication. *J. Hered.* 1979;70:301-308.

Belyaev D.K. Destabiliziruyushchiy otbor kak faktor domestikatsii. *Genetika i blagosostoyanie chelovechestva* [Destabilizing selection as a factor in domestication. *Genetics and Humanity Well-being*]. Moscow, Nauka, 1981.

Benelli A., Bertolini A., Poggioli R., Menozzi B., Basaglia R., Arletti R. Polymodal dose-response curve for oxytocin in the social recognition test. *Neuropeptides.* 1995;28(4):251-255. DOI 10.1016/0143-4179(95)90029-2

Bondar N.P., Kudryavtseva N.N. Impaired social recognition in male mice with repeated experience of aggression. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 2005; 55(3):378-384.

Bosch O.J., Neumann I.D. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. *Horm. Behav.* 2012;61(3):293-303. DOI 10.1016/j.yhbeh.2011.11.002

Bradshaw J.W.S., Paul E.S. Could empathy for animals have been an adaptation in the evolution of Homo? *Anim. Welfare.* 2010;19: 107-112.

Briine M. On human self-domestication, psychiatry, and eugenics. *Philos. Ethics Humanit. Med.* 2007;2:21. DOI 10.1186/1747-5341-2-21

Bülbül M., Babygirija R., Cerjak D., Yoshimoto S., Ludwig K., Takahashi T. Hypothalamic oxytocin attenuates CRF expression via GABA(A) receptors in rats. *Brain Res.* 2011;1387:39-45. DOI 10.1016/j.brainres.2011.02.091

Calcagnoli F., de Boer S.F., Althaus M., den Boer J.A., Koolhaas J.M. Antiaggressive activity of central oxytocin in male rats. *Psychopharmacology.* 2013;229:639-651. DOI 10.1007/s00213-013-3124-7

- Calcagnoli F., Meyer N., De B.S.F., Althaus M., Koolhaas J.M. Chronic enhancement of brain oxytocin levels causes enduring anti-aggressive and pro-social explorative behavioral effects in male rats. *Horm. Behav.* 2014;65:427-433. DOI 10.1016/j.yhbeh.2014.03.008
- Cho M.M., DeVries A.C., Williams J.R., Carter C.S. The effects of oxytocin and vasopressin on partner preferences in male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav. Neurosci.* 1999;113:1071-1079. DOI 10.1037/0735-7044.113.5.1071
- Darwin C. The expression of the emotions in man and animals. London: John Murray. 1872. (Russ. ed.: Darwin C. O vyrazhenii oshchushcheniy u cheloveka i zhivotnykh. Spb.: Tipografiya F.S. Sushchinskago, 1872).
- de Boer S.F., van der Vegt B.J., Koolhaas J.M. Individual variation in aggression of feral rodent strains: A standard for the genetics of aggression and violence? *Behav. Genet.* 2003;33:485-501. DOI 10.1023/A:1025766415159
- de Dreu C.K.W., Greer L.L., Kleef G.A.V., Shalvi S., Handgraaf M.J.J. Oxytocin promotes human ethnocentrism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:1262-1266. DOI 10.1073/pnas.1015316108
- de Jong T.R., Beiderbeck D.I., Neumann I.D. Measuring virgin female aggression in the female intruder test (FIT): Effects of oxytocin, estrous cycle, and anxiety. *PLoS One.* 2014;9:e91701. DOI 10.1371/journal.pone.0091701
- de Waal F.B.M. Putting the altruism back into altruism: the evolution of empathy. *Annu. Rev. Psychol.* 2008;59:279-300. DOI 10.1146/annurev.psych.59.103006.093625
- Domes G., Heinrichs M., Gläscher J., Büchel C., Braus D.F., Herpertz S.C. Oxytocin attenuates amygdala responses to emotional faces regardless of valence. *Biol. Psychiatry.* 2007;62:1187-1190. DOI 10.1016/j.biopsych.2007.03.025
- du Vigneaud V., Ressler C., Swan J.M., Roberts C.W., Katsoyannis P.G. Oxytocin: Synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.* 1954;76(12):3115-3118. DOI 10.1021/ja01641a004
- Eliava M., Melchior M., Knobloch-Bollmann H.S., Wahis J., da Silva Gouveia, Tang Y., Ciobanu A.C., Triana del Rio R., Roth L.C., Althammer F., Chavant V., Goumon Y., Gruber T., Busnelli M., Chini B., Tan L., Mitre M., Froemke R.C., Chao M.V., Giese G., Sprengel R., Kuner R., Poisbeau P., Seeburg P.H., Stoop R., Charlet A., Grinevich V. A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. *Neuron.* 2016;89(6):1291-1304. DOI 10.1016/j.neuron.2016.01.041
- Ferguson J.N., Aldag J.M., Insel T.R., Young L.J. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J. Neurosci.* 2001;21(20):8278-8285.
- Francis D.D., Champagne F., Meaney M.J. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 2000;12:1145-1148.
- Goodson J.L., Bass A.H., 2000. Forebrain peptides modulate sexually polymorphic vocal circuitry. *Nature.* 2000;403:769-772. DOI 10.1038/35001581
- Grinevich V., Desarménien M., Chini B., Tauber M., Muscatelli F. Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders *Front. Neuroanat.* 2015;8:164. DOI 10.3389/fnana.2014.00164
- Grinevich V., Knobloch-Bollmann H.S., Eliava M., Busnelli M., Chini B. Assembling the puzzle: Pathways of oxytocin signaling in the brain. *Biol. Psychiatry.* 2016;79(3):155-164. DOI 10.1016/j.biopsych.2015.04.013
- Hare B., Plyusnina I., Ignacio N., Schepina O., Stepika A., Wrangham R., Trut L. Social cognitive evolution in captive foxes is a correlated by-product of experimental domestication. *Curr. Biol.* 2005;15:226-230. DOI 10.1016/j.cub.2005.01.040
- Hare B., Wobber V., Wrangham R. The self-domestication hypothesis: evolution of bonobo psychology is due to selection against aggression. *Anim. Behav.* 2012;83:573-585. DOI 10.1016/j.anbehav.2011.12.007
- Hernádi A., Kis A., Kanizsár O., Tóth K., Miklósi B., Topál J. Intranasally administered oxytocin affects how dogs (*Canis familiaris*) react to the threatening approach of their owner and an unfamiliar experimenter. *Behav. Process.* 2015;119:1-5. DOI 10.1016/j.beproc.2015.07.001
- Huber D., Veinante P., Stoop R. Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science.* 2005;308:245-248. DOI 10.1126/science.1105636
- Insel T.R., Hulihan T.J. A gender-specific mechanism for pair bonding: Oxytocin and partner preference formation in monogamous voles. *Behav. Neurosci.* 1995;109:782-789. DOI 10.1037/0735-7044.109.4.782
- Jensen P. Behavior genetics and the domestication of animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2014;2:85-104. DOI 10.1146/annurev-animal-022513-114135
- Jurek B., Slattery D.A., Hiraoka Y., Liu Y., Nishimori K., Aguilera G., Neumann I.D., van den Burg E.H. Oxytocin regulates stress-induced CRF gene transcription through CREB-regulated transcription coactivator 3. *J. Neurosci.* 2015;35(35):12248-12260. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1345-14.2015
- Kirsch P., Esslinger C., Chen Q., Mier D., Lis S., Siddhanti S., Gruppe H., Mattay V.S., Gallhofer B., Meyer-Lindenberg A. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. *J. Neurosci.* 2005;25(49):11489-11493. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3984-05.2005
- Kis A., Bence M., Lakatos G., Pergel E., Turcsán B., Pluijmakers J., Vas J., Elek Z., Brúder I., Földi L., Sasvári-Székely M., Miklósi A., Rónai Z., Kubinyi E. Oxytocin receptor gene polymorphisms are associated with human directed social behavior in dogs (*Canis familiaris*). *PLoS ONE.* 2014;9:e83993. DOI 10.1371/journal.pone.0083993
- Kis A., Hernádi A., Kanizsár O., Gácsi M., Topál J. Oxytocin induces positive expectations about ambivalent stimuli (cognitive bias) in dogs. *Horm. Behav.* 2015;69:1-7. DOI 10.1016/j.yhbeh.2014.12.004
- Knobloch H.S., Grinevich V. Evolution of oxytocin pathways in the brain of vertebrates. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:31. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00031
- Knobloch H.S., Charlet A., Hoffmann L.C., Eliava M., Khrulev S., Cetin A.H., Osten P., Schwarz M. K., Seeburg P.H., Stoop R., Grinevich V. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron.* 2012;73:553-566. DOI 10.1016/j.neuron.2011.11.030
- Kujala M.V., Kujala J., Carlson S., Hari R. Dog experts' brains distinguish socially relevant body postures similarly in dogs and humans. *PLoS ONE.* 2012;7:e39145. DOI 10.1371/journal.pone.0039145
- Lucht M.J., Barnow S., Sonnenfeld C., Rosenberger A., Grabe H.J., Schroeder W., Völzke H., Freyberger H.J., Herrmann F.H., Kromer H., Roskopf D. Associations between the oxytocin receptor gene (OXTR) and affect, loneliness and intelligence in normal subjects. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2009;33:860-866. DOI 10.1016/j.pnpbp.2009.04.004
- Meinlschmidt G., Heim C. Sensitivity to intranasal oxytocin in adult men with early parental separation. *Biol. Psychiatry.* 2007;61:1109-1111. DOI 10.1016/j.biopsych.2006.09.007
- Miklósi Á., Kubinyi E., Topál J., Gácsi M., Virányi Z., Csányi V. A simple reason for a big difference: wolves do not look back at humans, but dogs do. *Cur. Biology.* 2003;13(9):763-766. DOI 10.1016/S0960-9822(03)00263-X
- Nagasawa M., Mitsui S., En S., Ohtani N., Ohta M., Sakuma Y., Onaka T., Mogi K., Kikusui T. Social evolution. Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds. *Science.* 2015;348:333-336. DOI 10.1126/science.1261022
- Neumann I.D. Brain Oxytocin: A key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20:858-865. DOI 10.1111/j.1365-2826.2008.01726.x
- Neumann I.D., Landgraf R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends Neurosci.* 2012;35:649-659. DOI 10.1016/j.tins.2012.08.004
- Nowak R., Boivin X. Filial attachment in sheep: Similarities and differences between ewe-lamb and human-lamb relationships. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2015;164:12-28. DOI 10.1016/j.applanim.2014.09.013

- Olazábal D.E., Young L.J. Variability in “spontaneous” maternal behavior is associated with anxiety-like behavior and affiliation in naive juvenile and adult female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Dev. Psychobiol.* 2005;47(2):166-178. DOI 10.1002/dev.20077
- Olazábal D.E., Young L.J. Oxytocin receptors in the nucleus accumbens facilitate “spontaneous” maternal behavior in adult female prairie voles. *Neuroscience.* 2006;141(2):559-568. DOI 10.1016/j.neuroscience.2006.04.017
- Olff M., Frijling J.L., Kubzansky L.D., Bradley B., Ellenbogen M.A., Cardoso C., Bartz J.A., Yee J.R., van Zuiden M. The role of oxytocin in social bonding, stress regulation and mental health: an update on the moderating effects of context and interindividual differences. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(9):1883-1894. DOI 10.1016/j.psyneuen.2013.06.019
- Oliva J.L., Rault J.-L., Appleton B., Lill A. Oxytocin enhances the appropriate use of human social cues by the domestic dog (*Canis familiaris*) in an object choice task. *Anim. Cogn.* 2015;18:767-775. DOI 10.1007/s10071-015-0843-7
- Palagi E., Nicotra V., Cordoni G. Rapid mimicry and emotional contagion in domestic dogs. *Roy. Soc. Open Sci.* 2015;2:150505. DOI 10.1098/rsos.150505
- Popik P., Vetulani J.M., van Ree. Low doses of oxytocin facilitate social recognition in rats. *Psychopharmacology (Berl.).* 1992;106(1):71-74.
- Price E.O. *Animal Domestication and Behavior.* Oxon, N.Y.: CABI, 2002.
- Rehn T., Handlin L., Uvnäs-Moberg K., Keeling L.J. Dogs’ endocrine and behavioural responses at reunion are affected by how the human initiates contact. *Physiol. Behav.* 2014;124:45-53. DOI10.1016/j.physbeh.2013.10.009
- Rilling J.K., Demarco A.C., Hackett P.D., Chen X., Gautam P., Stair S., Haroon E., Thompson R., Ditzen B., Patel R., Pagnoni G. Sex differences in the neural and behavioral response to intranasal oxytocin and vasopressin during human social interaction. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;39:237-248. DOI 10.1016/j.psyneuen.2013.09.022
- Rodrigues S.M., Saslow L.R., Garcia N., John O.P., Keltner D. Oxytocin receptor genetic variation relates to empathy and stress reactivity in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106:21437-21441. DOI 10.1073/pnas.0909579106
- Romero T., Nagasawa M., Mogi K., Hasegawa T., Kikusui T. Oxytocin promotes social bonding in dogs. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 2014;111:9085-9090. DOI 10.1073/pnas.1322868111
- Ross H.E., Young L.J. Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 2009;30:534-547. DOI 10.1016/j.yfrne.2009.05.004
- Scharrer E. Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen (Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische). *Z. Vergl. Physiol.* 1928;7:1-38. DOI 10.1007/BF00341151
- Shamay-Tsoory S.G., Fischer M., Dvash J., Harari H., Perach-Bloom N., Levkovitz Y. Intranasal administration of oxytocin increases envy and schadenfreude (gloating). *Biol. Psychiatry.* 2009;66:864-870. DOI 10.1016/j.biopsych.2009.06.009
- Somatic Transgenesis in Molecular Neuroendocrinology, Wiley and Son, 2016 (in press).
- Staes N., Stevens J.M.G., Helsen P., Hillyer M., Korody M., Eens M. Oxytocin and vasopressin receptor gene variation as a proximate base for inter- and intraspecific behavioral differences in bonobos and chimpanzees. *PLoS ONE.* 2014;9:e113364. DOI 10.1371/journal.pone.0113364
- Trut L., Oskina I., Kharlamova A. Animal evolution during domestication: The domesticated fox as a model. *BioEssays.* 2009;31:349-360. DOI 10.1002/bies.200800070
- Trut L.N., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. An experiment on fox domestication and debatable issues of evolution of the dog. *Russ. J. Genet.* 2004;40:644-655. DOI 10.1023/B:RUGE.0000033312.92773.c1
- Trut L.N., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. An experiment on fox domestication and debatable issues of evolution of the dog. *Genetika=Genetics (Moscow).* 2004;40(6):794-807.
- Viviani D., Charlet A., van den Burg E., Robinet C., Hurni N., Abatis M., Magara F., Stoop R. oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science.* 2011;333:104-107. DOI 10.1126/science.1201043
- Windle R.J., Kershaw Y.M., Shanks N., Wood S.A., Lightman S.L., Ingram C.D. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. *J. Neurosci.* 2004;24:2974-2982. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3432-03.2004
- Wittig R.M., Crockford C., Deschner T., Langergraber K.E., Ziegler T.E., Zuberbühler K. Food sharing is linked to urinary oxytocin levels and bonding in related and unrelated wild chimpanzees. *P. Roy. Soc. Lond. B Biol.* 2014;281:20133096. DOI 10.1098/rspb.2013.3096
- Yayou K., Ito S., Yamamoto N. Relationships between postnatal plasma oxytocin concentrations and social behaviors in cattle. *Anim. Sci. J.* 2015;86(8):806-813. DOI 10.1111/asj.12363
- Young L.J., Lim M.M., Gingrich B., Insel T.R. Cellular mechanisms of social attachment. *Horm. Behav.* 2001;40:133-138. DOI 10.1006/hbeh.2001.1691

Естественный и искусственный дефицит вазопрессина: почему последний является летальным?

Д. Зелена

Институт экспериментальной медицины, Будапешт, Венгрия

Технологии получения трансгенных мышей широко используются при анализе физиологических функций, однако к настоящему времени установлено, что 22,0 % исследованных нуль-мутаций являются летальными. Полное отсутствие вазопрессина (AVP) у трансгенных мышей приводит к их гибели к возрасту отъема от матери. Вместе с тем природные мутантные крысы Brattleboro, лишенные AVP, вполне жизнеспособны. Безусловно, AVP имеет существенное значение для выживания, однако какая из его разнообразных функций является наиболее важной для этого – остается неясным. AVP оказывает свое действие через специфические рецепторы плазматической мембраны. Рецепторы V1a типа могут вызывать сужение кровеносных сосудов для поддержания артериального давления в течение гиповолемии. Рецептор V1b в передней доле гипофиза играет важную роль в адаптации к стрессу. Рецепторы V2 подтипа, экспрессируемые в почках, способствуют задержке воды в организме. Ген *avp* содержит последовательности нуклеотидов, кодирующие сигнальный пептид, собственно AVP, нейрофизин 2 и C-терминальный гликопептид. Возникшая естественным путем мутация в районе, кодирующем нейрофизин, вызывает сдвиг рамки считывания и тем самым приводит к появлению AVP-дефицитных крыс Браттлборо (Brattleboro) с центральным несахарным диабетом. В гипоталамусе этих животных AVP не синтезируется, однако в некоторых периферических тканях этот гормон способен экспрессироваться, что предполагает наличие альтернативного пути его синтеза. Нокаутные по *avp* мыши жизнеспособны к моменту рождения, но без периферического введения AVP они погибают. Сравнивая имеющиеся модели дефицита AVP, можно заключить, что одновременная утрата эффектов, опосредуемых V1a и V2 рецепторами, а именно артериальная гипотензия и потеря воды, способна быть причиной летальности. Как у крыс Браттлборо, так и нокаутных по *avp* мышей возможно сохранение локального синтеза AVP в сердце, и этот гормон может поступать в общую циркуляцию. Таким образом, у этих животных сужение сосудов может компенсировать гиповолемию.

Ключевые слова: крысы Браттлборо; мыши, нокаутные по вазопрессину; ген вазопрессина; рецепторы вазопрессина; гиповолемия.

Comparison of natural and artificial vasopressin deficiency: why the latter is lethal?

D. Zelena

Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary

The transgenic mouse technology is widespread, however, until now 22.0 % of tested null mutations was found to be lethal. The complete lack of vasopressin (AVP) resulted also in preweaning lethality. It is surprising take into consideration the viability of the AVP mutant Brattleboro rats. Thus, AVP is essential for survival, but which of its ubiquitous role is the most important. AVP exerts its effect through specific plasma membrane receptors. V1a receptors can induce vasoconstriction maintaining blood pressure during hypovolemia. The V1b receptor on the anterior pituitary has a role in stress adaptation. The V2 subtype is located in the kidney and contributes to the antidiuresis. The *avp* gene consists of a signal peptide, AVP, neurophysin 2 and a C-terminal glycopeptide. The naturally occurring AVP-deficient Brattleboro rat has a frameshift mutation in the neurophysin portion resulting in central diabetes insipidus. In its hypothalamus AVP is not produced, while in certain peripheral tissues it may be expressed, suggesting the existence of a different synthetic pathway. The *avp* knockout mice can also be produced, they will be born, but without peripheral AVP administration they will not survive. Comparing available knockout models we can conclude that the combined V1a and V2 receptor mediated effects, namely hypotension and water lost together may lead to lethality. As in Brattleboro and targeted knockout mice the local synthesis of AVP in the heart can be maintained and AVP can be released into the general circulation. Thus, in these animals vasoconstriction can compensate the hypovolemia.

Key words: Brattleboro rat, vasopressin knockout mice, vasopressin gene, vasopressin receptors, hypovolaemia.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Зелена Д. Естественный и искусственный дефицит вазопрессина: почему последний является летальным? Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):228-233. DOI 10.18699/VJ16.142

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zelena D. Comparison of natural and artificial vasopressin deficiency: why the latter is lethal? Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):228-233. DOI 10.18699/VJ16.142

REVIEW

Received 20.10.2015 r.

Accepted for publication 18.11.2015 r.

© AUTHOR 2016



e-mail: zelena.dora@koki.mta.hu

Нокаутные животные. Для изучения роли той или иной молекулы в организме основным инструментом является нарушение ее мишени. Технология получения трансгенных мышей разрабатывалась в начале 1980-х (Hanahan et al., 2007), а первые нокаутные мыши были созданы в 1989 г. (<http://www.nature.com/scitable/content/Knockout-mice-timeline-6638351>). Ученые, чьи новаторские исследования привели к созданию «нокаутных» мышей, были отмечены Нобелевской премией 2007 г. В настоящее время этот метод применяется практически во всех областях биомедицины: от фундаментальных исследований до разработки новых методов лечения. На сегодняшний день более чем десять тысяч генов мыши (примерно половина генов в геноме млекопитающих) были «нокаутированы», и огромный объем данных стал доступен благодаря этой технологии (например, результаты поиска в PubMed по ключевым словам «knockout mice» дают более чем 110 тыс. ссылок). Международный консорциум «Нокаутная мышь» (International Knock-out Mouse Consortium, IKMC) систематически создает мутантов эмбриональных стволовых клеток для каждого гена в геноме мыши (20 тыс. белок-кодирующих генов), а Международный консорциум фенотипирования (International Mouse Phenotyping Consortium, IMPC) описывает фенотипы этих мышей. Сейчас установлено, что нуль-мутации по 22,0 % исследованных генов на генетическом фоне B6N летальны (<https://www.mousephenotype.org/data/phenotypes/MP:0011100>).

Полное отсутствие вазопрессина (AVP) приводит трансгенных мышей к гибели в возрасте отъема от матери (<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:88121>). Это несколько удивительно, учитывая жизнеспособность крыс линии Браттлборо, мутантных по гену *avp*. Однако эта линия является результатом спонтанной мутации. Что касается спонтанных мутаций, то существуют «нормальные» вариации в пределах каждой линии, и животные могут быть селектированы по конкретному признаку, как, например, крысы и мыши – на высокий или низкий уровень тревожности (Landgraf, Wigger, 2003, Landgraf et al., 2007), и их генетический фон может быть изучен. Вместе с тем за различия индивидов по определенному признаку в большинстве случаев отвечает не один ген. Иногда нокаут животных помогает идентифицировать мутацию, обуславливающую наследственное заболевание (Fuguse, 2009). С другой стороны, в природе у некоторых животных встречаются мутации одного гена, приводящие к патологическому фенотипу, как, например, мутация Piebald-Lethal в гене рецептора эндотелина-В, ведущая к утрате сегмента толстой кишки, как при болезни Гиршпрунга (Hirschsprung disease; Hosoda et al., 1994). Природная мутация, имитирующая несахарный диабет, произошла у одной из самок крыс в колонии Long Evans, имевшей 17 потомков, родившихся 24 февраля 1960 г. в Вермонте, в Западной Браттлборо (Valtin, 1982). Поскольку некоторые из потомков этой самки потребляли аномально большое количество воды и это можно было скорректировать применением AVP, было установлено, что эти животные имеют наследственный гипоталамический несахарный диабет (diabetes insipidus – DI). После первого описания

этого феномена уже было опубликовано более 1 500 статей, прежде чем в 1984 г. (Schmale, Richter, 1984) была установлена генетическая основа этой патологии.

Роль вазопрессина в организме

Судя по тому, что AVP повсеместно присутствует у множества видов, он имеет важное значение для выживания, однако мы можем только догадываться, которая из его многообразных функций является наиболее важной. AVP оказывает свое влияние путем взаимодействия с рецепторами ряда типов, локализованными в плазматической мембране клетки и имеющими семь трансмембранных доменов (Zelena, 2012). Рецепторы V1a подтипа (сосудистые) широко распространены в клетках гладких мышц сосудов, кардиомиоцитах, гепатоцитах и тромбоцитах, а также в отдельных областях головного мозга, например в латеральной перегородке, гиппокампе, гипоталамусе. Подтип рецептора V1b (гипофизарный) был первоначально описан в передней доле гипофиза, но он также был обнаружен во многих других тканях, таких как, например, островки Лангерганса поджелудочной железы, мозговое вещество надпочечников и собирательные трубки внутреннего мозгового отдела почек. В головном мозге V1b рецепторы были найдены в обонятельной луковице, перегородке, коре головного мозга, гиппокампе, гипоталамусе и некоторых других областях. Рецепторы AVP V2 типа (почечные) находятся в базолатеральной мембране клеток собирательных трубок почек. Вне почек мРНК V2 рецепторов была обнаружена только в мозжечке.

Самой известной функцией циркулирующего AVP является антидиурез в почках, где он играет роль гормона периферической вазопрессинергической системы (Ring, 2005). Нарушения в этой системе приводят к DI, характеризующему экскрецией больших количеств мочи и компенсационным потреблением больших количеств жидкостей, которые могут угрожать жизни, если эти нарушения не предотвращать. DI является редким заболеванием, наблюдаемым с частотой 1 на 25 тыс. человек. Наиболее распространенной формой является центральная, нейрогенная DI, при которой поврежден AVP, тогда как при периферической (почечной, или нефрогенной) форме имеется нарушение его рецептора V2 типа или белка аквапорина 2, являющегося водным каналом. Важными причинами DI центрального генеза могут быть повреждения в результате черепно-мозговых травм, опухолей головного мозга, хирургии, некоторых заболеваний и инфекций или кровоизлияний в мозг, однако 50 % случаев являются идиопатическими. Исследования показывают, что некоторые из этих случаев могут иметь аутоиммунную основу. Генетические аномалии также могут привести к DI центральной и периферической природы.

Кроме антидиуреза, большие дозы AVP через V1a рецепторы могут вызывать сокращение практически любой гладкомышечной ткани в организме, но сомнительно, что это имеет хоть какое-то существенное физиологическое значение. Тем не менее циркулирующий AVP важен для поддержания артериального давления, когда животные находятся в гиповолемическом состоянии (Ganong, 1984). AVP, действуя через V1b рецепторы, является важным

регулятором гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, внося тем самым существенный вклад в адаптацию к стрессу (Zelena, 2012).

AVP проявляет митогенную активность (Serradeil-Le Gal et al., 1994), особенно в мезангиальных клетках (Tahara et al., 2011), и способствует гипертрофии кардиомиоцитов (Hiroyama et al., 2007). Этот гормон также является прямым иммунорегулятором. Удаление задней доли гипофиза снижало клеточный иммунный ответ, который восстанавливался с помощью агониста V2 рецепторов десмопрессина (Quintanar-Stephano et al., 2012). AVP способен оказывать прямое влияние на метаболизм, вызывая гипергликемию и глюкозурию через V1a рецепторы (Montero et al., 2006). Кроме того, AVP повышает выживаемость клеток при их повреждении гипоксией – реоксигенацией (Zhu et al., 2013) и защищает нейроны гиппокампа от апоптоза, индуцированного недостатком питательных веществ или глутаматом (Chen, Aguilera, 2010). Все эти эффекты могут внести свой вклад в положительные последствия введения AVP при септическом шоке (Oba, Lone, 2014).

В ходе онтогенеза этот гормон способен стимулировать рост отростков нейронов (нейротрофизм) (Chen et al., 2000), а также дифференцировку клеток печени (Serriere et al., 2008). AVP также способен ингибировать пролиферацию злокачественных клеток (Forti, Armelin, 2011). Введенный мышам, он повышал формирование остеокластов, резорбирующих кость, и понижал образование остеобластов, формирующих кость, соответственно (Tamma et al., 2013).

Роль AVP в нервной регуляции различных форм поведения также хорошо установлена. Этот гормон способен влиять на поведенческие проявления, по крайней мере, пяти видов: циркадную ритмичность, восприятие боли, социальное поведение, обучение и память, а также на вызываемые стрессом эмоции тревоги и депрессии (Zelena, 2012).

Ген вазопрессина и его известные естественные варианты

Древний нонапептид аргинин вазотоцин присутствует в настоящее время у всех позвоночных, исключая млекопитающих (Neumann, Landgraf, 2008), и даже у некоторых морских видов более ранних этапов эволюции, а также у насекомых (Zelena, 2012). AVP, заменивший вазотоцин у большинства млекопитающих, отличается от последнего заменой только одного аминокислотного остатка. Ген вазотоцина дуплицировался 450 млн лет назад, дав основу образованию окситоцин-подобных пептидов (у рыб – изотоцин), отличающихся от AVP только одним аминокислотным остатком. В связи с этим возникло четкое разделение функций между AVP, регулирующим экономию воды и энергии, и окситоцином, осуществляющим контроль над сокращением мускулатуры матки и выделением молока.

Размер гена *avp* составляет примерно 2 КБ. Он находится на 20-й хромосоме у человека (в 13-й позиции, от 3082554 до 3093520 пары оснований), 7-й хромосоме у крысы и 2-й хромосоме у мыши (пары оснований от 130580620 до 130582554) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

gene). Этот ген состоит из 3 экзонов и 2 интронов, кодирующих сигнальный пептид (19 аминокислот в первом экзоне); гормон AVP (9 аминокислот также в первом экзоне); нейрофизин 2 (NP2, 93 аминокислоты), кодируемый всеми тремя экзонами, и С-концевой гликопептид кокептин (39 аминокислот в третьем экзоне) в перечисленном порядке (Iwasaki et al., 2000, Koufaris et al., 2015). Особенностью мРНК *avp* является наличие 3'-поли(А) конца, который регулируется в зависимости от осмотических проблем и, как известно, повышает эффективность трансляции и увеличивает стабильность этой мРНК (Carrazana et al., 1988). Обычно период полураспада мРНК *avp* – 6 ч. Препрогормон адресуется сигнальным пептидом в эндоплазматический ретикулум, где этот пептид отщепляется, а кокептин гликозилируется. После расщепления и модификации в ходе транспортировки по аксонам из гипоталамуса в заднюю долю гипофиза гормон AVP и его белковый носитель, NP2, секретируются (Grant et al., 1993).

Ранее упоминавшиеся крысы Браттлборо имеют мутацию – отсутствие одного нуклеотида во втором экзоне, обуславливающую сдвиг рамки считывания в части гена *avp*, кодирующей NP2, но способны синтезировать окситоцин и его нейрофизин (NP1). Гипоталамус этих крыс содержит обнаруживаемое, хотя и заметно пониженное количество транскрипта гена *avp*, фактически неотличимое по размеру от мРНК нормального *avp* (Majzoub et al., 1987). Однако мутантный вариант мРНК *avp* не реагирует на отклонения от нормы осмотических и объемных параметров циркулирующей жидкости (Majzoub et al., 1987), и его трансляция нарушена (Schmale et al., 1984). Поскольку это рецессивная мутация, лишь гомозиготные животные не способны синтезировать гипоталамический AVP и связанный с ним NP. Мутация приводит к потере стоп-кодона с последующей трансляцией длинного поли(А) хвоста, генерирующего длинный полилизинный С-конец, препятствующий правильной трансляции мутантной мРНК. Еще более вероятно, что изменения в аминокислотной последовательности в кодирующей области сами по себе являются причиной нарушения трансляции *avp*, поскольку искусственно созданные мутантные клетки с нормальным стоп-кодоном также не экспрессировали AVP.

Хотя большинство случаев центральных DI, наблюдаемых в клинической практике, являются приобретенными, однако естественно происходящие мутации также были обнаружены у пациентов с нейрогенной семейной DI (Iwasaki et al., 2000, Babey et al., 2011). Крысы Браттлборо имеют рецессивную аутосомную мутацию, в то время как семейные нейрогипофизарные DI человека почти всегда наследуются по аутосомно-доминантному типу, и лишь только несколько семей с этой патологией демонстрируют ее аутосомно-рецессивный тип наследования (Koufaris et al., 2015). В гене *avp* было описано по крайней мере 60 мутаций, способных вызвать у человека нейрогипофизарную форму DI. Большинство из этих мутаций (в основном в области NP) приводят к замене аминокислот в препрогормоне или к образованию аномально короткой версии этой молекулы. Исследования показывают, что измененные мутациями молекулы препрогормона не способны покинуть клетку и оказываются в ней, как в ловушке.

Дефектные молекулы с течением времени накапливаются и в конечном итоге повреждают и убивают эти клетки, что приводит к дефициту AVP и в результате к DI.

Небольшие изменения в гене *avp* (например, однонуклеотидные замены в регуляторных областях гена) могут вызвать избыточную экспрессию и чрезмерную секрецию AVP, результатом которых будет не DI, но высокая тревожность, как это было обнаружено у крыс (Landgraf et al., 2007).

Особенности крыс Браттлборо и нокаутных мышей

В гипоталамусе крыс Браттлборо пептид AVP не синтезируется, но в некоторых периферических тканях он способен экспрессироваться. К таким тканям относятся надпочечники, в которых обнаруживается AVP (Nussey et al., 1984), и, в отличие от мутантного *avp* гипоталамуса, экспрессия надпочечникового AVP реагирует на геморагию (Somova et al., 1986). Обнаружение у крыс Браттлборо экспрессии AVP также в яичниках (Lim et al., 1984), семенниках и гастродуоденальном тракте (Friedmann et al., 1993a, b) предполагает наличие путей синтеза, отличных от функционирующих в нейронах гипоталамуса. Действительно, мРНК *avp* периферических тканей обладает очень коротким поли(А) хвостом, который приводит к удлинению полипептидной цепи при ее синтезе примерно лишь на 10 остатков лизина на С-конце (Ivell et al., 1986). Этот предшественник гормона затем способен нормально транслироваться, что позволяет ему избежать исключения из правильного пути превращения в зрелый гормон, и, таким образом, AVP может быть упакован в гранулы и нормально секретирован.

Несоответствия между центральным и периферическим синтезом AVP представляются взаимно противоречивыми, однако мыши со сверхэкспрессией *avp*, несущие в гетерозиготном варианте копию гена *avp*, слитого с 35 парами оснований, содержащих последовательность, обеспечивающую его экспрессию и в нейронах, также имели некоторые нейроспецифические особенности (Habener et al., 1989). Отметим, что водный баланс у этих трансгенных животных не был изменен (Grant et al., 1993, Miller et al., 1993).

Мыши-нокауты по *avp* также были получены. Они рождаются, но без периферического введения AVP не выживают (личное сообщение JA Majzoub и <https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:88121>). Поскольку отсутствие AVP не вызывает внутриутробной летальности, роль AVP в регуляции развития не может быть конечной причиной смерти. Так как периферически введенный AVP не проходит через гематоэнцефалический барьер (Ermisch et al., 1985), следует предположить, что фундаментальная витальная роль этого гормона реализуется через периферические рецепторы. Правдоподобным объяснением может явиться сохранение воды путем действия гормона через V2 рецепторы, поскольку без лечения DI в долгосрочной перспективе может привести к смерти. Тем не менее крысы Браттлборо также имеют фенотип DI, который не является летальным. Еще одной причиной могут быть физические – размерные различия между мышами и крысами, так как водно-солевой гомеостаз

особи меньшего размера может быть более уязвимым (например, дети более уязвимы к обезвоживанию, чем взрослые (<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Electrolyte+Supplements>). Это предположение отчасти подтверждается отсутствием мышей-нокаут по рецептору V2 типа, однако не ясно, являются ли носители такой мутации нежизнеспособными, или же просто никто не был заинтересован в ее получении. Вместе с тем искусственно созданные мыши-нокауты по *avp*, у которых синтез гормона блокирован только в гипоталамусе (nucleus paraventricularis hypothalami, nucleus supraopticus hypothalami and nucleus suprachiasmaticus), имея DI фенотип, очень похожий на таковой у крыс Браттлборо, все равно остаются жизнеспособными (*Avp^{tm1Hari}*, *Avp^{tm1Lja}*) (<http://www.informatics.jax.org/allele/summary?markerId=MGI:88121>). Кроме того, антагонисты рецептора V2 широко используются для лечения сердечной недостаточности и дают благоприятный терапевтический эффект (Izumi et al., 2014). Возражением может быть то, что блокада какого-либо эффекта в зрелом возрасте по своим последствиям может существенно отличаться от его врожденного отсутствия.

Отметим, что созданные мыши с нокаутами по V1a (Bielsky et al., 2004, Egashira et al., 2004) или V1b (Tanoue et al., 2004, Roper et al., 2010), а также с двойными нокаутами по V1a/V1b (Nakamura et al., 2009) AVP рецепторам сохраняли способность к репродукции, и их потомство является жизнеспособными без какой-либо терапии, свидетельствуя о том, что летальный эффект нокаута по гену *avp* не может быть связан с гипотонией из-за отсутствия вазоконстрикции (V1a) или нарушенной адаптации к стрессу (V1b).

Поэтому можно предположить, что одновременное нарушение эффектов AVP, опосредуемых V1a и V2 рецепторами, а именно артериальная гипотензия и потеря воды, совместно приводят к летальному исходу, но оба рецептора могут лишиться своего лиганда как у крыс Браттлборо, так и нокаутных мышей. Однако присутствуют локальный синтез AVP в сердце (по крайней мере у крыс), а также выделение гормона в сердечный кровоток (Hupf et al., 1999). Хотя это и не подтверждено экспериментально, но как у крыс Браттлборо, так и нокаутных животных эта система может быть сохранена и производить достаточное количество AVP для обеспечения сердечно-сосудистого эффекта, который способен компенсировать гиповолемию, индуцированную избыточным оттоком мочи (Ganong, 1984). Действительно, V1a рецепторы присутствуют у животных линии Браттлборо, и их число даже изменяется в соответствии с циркадным ритмом (Young et al., 1993).

В целом AVP имеет жизненно важное значение прежде всего из-за его роли в поддержании циркуляции путем регуляции не только задержки воды в почках, но также сосудосуживающего действия. В более широком смысле эффекты AVP способствуют повышению качества жизни, влияя на процессы обширного спектра: от метаболизма, иммунитета, ремоделирования скелета и вплоть до психического благополучия.

Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

References

- Babey M., Kopp P., Robertson G.L. Familial forms of diabetes insipidus: clinical and molecular characteristics. *Nature Rev. Endocrinol.* 2011;7:701-714.
- Bielsky I.F., Hu S.B., Szegda K.L., Westphal H., Young L.J. Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology.* 2004;29:483-493.
- Carrazana E.J., Pasieka K.B., Majzoub J.A. The vasopressin mRNA poly(A) tract is unusually long and increases during stimulation of vasopressin gene expression in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 1988;8:2267-2274.
- Chen J., Aguilera G. Vasopressin protects hippocampal neurones in culture against nutrient deprivation or glutamate-induced apoptosis. *J. Neuroendocrinol.* 2010;22:1072-1081.
- Chen Q., Patel R., Sales A., Oji G., Kim J., Monreal A.W., Brinerton R.D. Vasopressin-induced neurotrophism in cultured neurons of the cerebral cortex: dependency on calcium signaling and protein kinase C activity. *Neuroscience.* 2000;101:19-26.
- Egashira N., Tanoue A., Higashihara F., Mishima K., Fukue Y., Takanoto Y., Tsujimoto G., Iwasaki K., Fujiwara M. V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci. Lett.* 2004;356:195-198.
- Ermisch A., Ruhle H.J., Landgraf R., Hess J. Blood-brain barrier and peptides. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 1985;5:350-357.
- Forti F.L., Armelin H.A. Arginine vasopressin controls p27(Kip1) protein expression by PKC activation and irreversibly inhibits the proliferation of K-Ras-dependent mouse Y1 adrenocortical malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1813:1438-1445.
- Friedmann A.S., Memoli V.A., Cheng S.W., Yu X., North W.G. Vasopressin and vasopressin-associated neurophysin are present in gastric and duodenal cells of Brattleboro and Long-Evans rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1993a;689:522-525.
- Friedmann A.S., Memoli V.A., Yu X.M., North W.G. Biosynthesis of vasopressin by gastrointestinal cells of Brattleboro and Long-Evans rats. *Peptides.* 1993b;14:607-612.
- Furuse M. Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1788:813-819.
- Ganong W.F. Neuropeptides in cardiovascular control. *J. Hypertension.* 1984;2:S15-S23.
- Grant F.D., Reventos J., Kawabata S., Miller M., Gordon J.W., Majzoub J.A. Transgenic mouse models of vasopressin expression. *Hypertension.* 1993;22:640-645.
- Habener J.F., Cwikel B.J., Hermann H., Hammer R.E., Palmiter R.D., Brinster R.L. Metallothionein-vasopressin fusion gene expression in transgenic mice. Nephrogenic diabetes insipidus and brain transcripts localized to magnocellular neurons. *J. Biol. Chem.* 1989;264:18844-18852.
- Hanahan D., Wagner E.F., Palmiter R.D. The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes Developm.* 2007;21:2258-2270.
- Hiroyama M., Wang S., Aoyagi T., Oikawa R., Sanbe A., Takeo S., Tanoue A. Vasopressin promotes cardiomyocyte hypertrophy via the vasopressin V1a receptor in neonatal mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;559:89-97.
- Hosoda K., Hammer R.E., Richardson J.A., Baynash A.G., Cheung J.C., Giaid A., Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell.* 1994;79:1267-1276.
- Hupf H., Grimm D., Riegger G.A., Schunkert H. Evidence for a vasopressin system in the rat heart. *Circulation Res.* 1999;84:365-370.
- Ivell R., Schmale H., Krisch B., Nahke P., Richter D. Expression of a mutant vasopressin gene: differential polyadenylation and read-through of the mRNA 3' end in a frame-shift mutant. *EMBO J.* 1986;5:971-977.
- Iwasaki Y., Oiso Y., Saito H., Majzoub J.A. Effects of various mutations in the neurophysin/glycopeptide portion of the vasopressin gene on vasopressin expression in vitro. *Tohoku J. Exp. Med.* 2000;191:187-202.
- Izumi Y., Miura K., Iwao H. Therapeutic potential of vasopressin-receptor antagonists in heart failure. *J. Pharmacol. Sci.* 2014;124:1-6.
- Koufaris C., Alexandrou A., Sismani C., Skordis N. Identification of an AVP-NP11 mutation within the AVP moiety in a family with neurohypophyseal diabetes insipidus: review of the literature. *Hormones.* 2015;14:442-446.
- Landgraf R., Kessler M.S., Bunck M., Murgatroyd C., Spengler D., Zimbelmann M., Nussbaumer M., Czibere L., Turck C.W., Singewald N., Rujescu D., Frank E. Candidate genes of anxiety-related behavior in HAB/LAB rats and mice: focus on vasopressin and glyoxalase-I. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2007;31:89-102.
- Landgraf R., Wigger A. Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress.* 2003;6:111-119.
- Lim A.T., Lolait S.J., Barlow J.W., Autelitano D.J., Toh B.H., Boublik J., Abraham J., Johnston C.I., Funder J.W. Immunoreactive arginine-vasopressin in Brattleboro rat ovary. *Nature.* 1984;310:61-64.
- Majzoub J.A., Carrazana E.J., Shulman J.S., Baker K.J., Emanuel R.L. Defective regulation of vasopressin gene expression in Brattleboro rats. *Amer. J. Physiol.* 1987;252:E637-E642.
- Miller M., Kawabata S., Wiltshire-Clement M., Reventos J., Gordon J.W. Increased vasopressin secretion and release in mice transgenic for the rat arginine vasopressin gene. *Neuroendocrinology.* 1993;57:621-625.
- Montero S., Mendoza H., Valles V., Lemus M., Alvarez-Buylla R., de Alvarez-Buylla E.R. Arginine-vasopressin mediates central and peripheral glucose regulation in response to carotid body receptor stimulation with Na-cyanide. *J. Appl. Physiol.* 2006;100:1902-1909.
- Nakamura K., Aoyagi T., Hiroyama M., Kusakawa S., Mizutani R., Sanbe A., Yamauchi J., Kamohara M., Momose K., Tanoue A. Both V(1A) and V(1B) vasopressin receptors deficiency result in impaired glucose tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;613:182-188.
- Neumann I.D., Landgraf R. Advances in vasopressin and oxytocin – from genes to behaviour to disease. Preface. *Progr. Brain Res.* 2008;170:XI-XIII.
- Nussey S.S., Ang V.T., Jenkins J.S., Chowdrey H.S., Bisset G.W. Brattleboro rat adrenal contains vasopressin. *Nature.* 1984;310:64-66.
- Oba Y., Lone N.A. Mortality benefit of vasopressor and inotropic agents in septic shock: a Bayesian network meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Crit. Care.* 2014;29:706-710.
- Quintanar-Stephano A., Organista-Esparza A., Chavira-Ramirez R., Kovacs K., Berezi I. Effects of neurointermediate pituitary lobectomy and desmopressin on acute experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Neuroimmunomodulation.* 2012;19:148-157.
- Ring R.H. The central vasopressinergic system: examining the opportunities for psychiatric drug development. *Curr. Pharm. Design.* 2005;11:205-225.
- Roper J.A., Craighead M., O'Carroll A.M., Lolait S.J. Attenuated stress response to acute restraint and forced swimming stress in arginine vasopressin 1b receptor subtype (Avpr1b) receptor knockout mice and wild-type mice treated with a novel Avpr1b receptor antagonist. *J. Neuroendocrinol.* 2010;22:1173-1180.
- Schmale H., Ivell R., Breindl M., Darmer D., Richter D. The mutant vasopressin gene from diabetes insipidus (Brattleboro) rats is transcribed but the message is not efficiently translated. *EMBO J.* 1984;3:3289-3293.
- Schmale H., Richter D. Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature.* 1984;308:705-709.
- Serradeil-Le Gal C., Bourrie B., Raufaste D., Carayon P., Garcia C., Maffrand J.P., Le Fur G., Casellas P. Effect of a new, potent, non-peptide V1a vasopressin antagonist, SR 49059, on the binding and the mitogenic activity of vasopressin on Swiss 3T3 cells. *Biochem. Pharmacol.* 1994;47:633-641.

- Serriere V., Tran D., Stelly N., Claret M., Alonso G., Tordjmann T., Guillon G. Vasopressin-induced morphological changes in polarized rat hepatocyte multiplies: dual calcium-dependent effects. *Cell Calcium*. 2008;43:95-104.
- Somova L., Ivanova E., Zaharieva S., Machuganska A. Changes of adrenal vasopressin during hemorrhagic shock in rats with hereditary diabetes insipidus (Brattleboro strain). *Acta Physiol. Pharmacol. Bulgarica*. 1986;12:70-75.
- Tahara A., Tsukada J., Tomura Y., Yatsu T., Shibasaki M. Vasopressin regulates rat mesangial cell growth by inducing autocrine secretion of vascular endothelial growth factor. *J. Physiol. Sci.* 2011;61: 115-122.
- Tamma R., Sun L., Cuscito C., Lu P., Corcelli M., Li J., Colaianne G., Moonga S.S., Di Benedetto A., Grano M., Colucci S., Yuen T., New M.I., Zallone A., Zaidi M. Regulation of bone remodeling by vasopressin explains the bone loss in hyponatremia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013;110:18644-18649.
- Tanoue A., Ito S., Honda K., Oshikawa S., Kitagawa Y., Koshimizu T.A., Mori T., Tsujimoto G. The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin. Invest.* 2004;113:302-309.
- Valtin H. The discovery of the Brattleboro rat, recommended nomenclature, and the question of proper controls. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982;394:1-9.
- Young W.S., 3rd, Kovacs K., Lolait S.J. The diurnal rhythm in vasopressin V1a receptor expression in the suprachiasmatic nucleus is not dependent on vasopressin. *Endocrinology*. 1993;133:585-590.
- Zelena D. Vasopressin in health and disease with a focus on affective disorders. *Central Nervous Syst. Agents Med. Chem.* 2012;12: 286-303.
- Zhu W., Tilley D.G., Myers V.D., Coleman R.C., Feldman A.M. Arginine vasopressin enhances cell survival via a G protein-coupled receptor kinase 2/beta-arrestin1/extracellular-regulated kinase 1/2-dependent pathway in H9c2 cells. *Mol. Pharmacol.* 2013;84:227-235.

Влияние вазопрессина на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма гиалуронана интерстициальной ткани, и на концентрирующую функцию почки крыс WAG

Л.Н. Иванова^{1, 2}, А.В. Бабина^{1, 2}✉, Г.С. Батурина¹, Л.Е. Каткова¹

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

Аргинин-вазопрессин (АВП) у млекопитающих является главным гормоном, регулирующим реабсорбцию воды в почке путем повышения осмотической проницаемости эпителия собирательных трубок. Основным звеном внутриклеточных реакций, индуцированных АВП, является транслокация везикул, содержащих водные каналы (аквапорины-2), в плазматическую мембрану главных клеток эпителия собирательных трубок. В интерстиции внутреннего мозгового вещества почки сосредоточено значительное количество отрицательно заряженного гликозаминогликана, гиалуронана, который может влиять на диффузию воды между структурами концентрирующего механизма в зависимости от состояния его полимерности. Вопрос о роли гиалуронана в регуляции транспорта воды в почке млекопитающих остается дискуссионным. С использованием ОТ-ПЦР реального времени проверялась гипотеза о вовлечении генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма гиалуронана, в долговременный эффект вазопрессина на концентрирующую функцию почек. Экспрессия генов гиалуронан-синтазы 2 (*Has2*), гиалуронидазы-1 и гиалуронидазы-2 (*Hyal1* и *Hyal2*), исследована в почке гидратированных крыс линии WAG (Wistar Albino Glaxo) и у крыс, которым в течение двух дней внутрибрюшинно вводился селективный агонист V₂-рецепторов вазопрессина dDAVP (200 мкг/кг веса тела, дважды в день внутрибрюшинно). Содержание мРНК *Has2* было наиболее высоким в мозговом веществе, сосочке почки гидратированных крыс. dDAVP индуцировал значительное снижение содержания мРНК *Has2* в этой зоне, в корковом веществе изменения были менее выражены. В противоположность *Has2*, введение dDAVP сопровождалось значительным повышением содержания мРНК *Hyal1* и *Hyal2* в сосочке почки, при этом наблюдались выраженное повышение активности гиалуронидазы в почечной ткани и нарастание осмолярности отделяющейся мочи. Предполагается, что вазопрессин ингибирует синтез гиалуронана и одновременно стимулирует его деградацию в интерстициальной ткани сосочка почки, повышая проницаемость матрикса и облегчая ток воды между элементами противоточной концентрирующей системы путем регуляции экспрессии генов ключевых ферментов метаболизма гиалуронана.

Ключевые слова: вазопрессин; почка; гиалуронан; гиалуронан-синтаза-2; гиалуронидаза-1, 2; экспрессия генов; осмотическое концентрирование.

Effect of vasopressin on the expression of genes for key enzymes of interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys

L.N. Ivanova^{1, 2}, A.V. Babina^{1, 2}✉, G.S. Baturina¹, L.E. Katkova¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

In mammals, arginine-vasopressin (AVP) is a major hormone involved in the regulation of renal water reabsorption, acting via an increase in the osmotic permeability of the collecting duct epithelium. The AVP-induced intracellular events include, as an essential step, the trafficking of the vesicles containing the water channels, aquaporin-2, to the apical plasma membrane of the collecting duct principal cells. The interstitium of the renal inner medulla contains abundant linear negatively charged glycosaminoglycan hyaluronan (HA), which affects the water flow depending on their polymeric state. Using real-time RT-PCR, we tested the assumption that the renal hyaluronan may be involved in the long-term vasopressin effect on water reabsorption. The expression of the genes encoding hyaluronan synthase-2 (*Has2*) and hyaluronidase-1, 2 (*Hyal1*, *Hyal2*) in the kidneys of Wistar Albino Glaxo (WAG) was studied. *Has2* mRNA content was the highest in the kidney papilla of the hydrated rats. The V₂ receptor-selective vasopressin analog dDAVP (100 µg/kg bw, ip, twice a day for 2 days) induced a considerable decrease in *Has2* mRNA content in the papilla with less pronounced changes in the cortex. In contrast to *Has2*, dDAVP treatment caused a significant increase in *Hyal1* and *Hyal2* mRNA content in the renal papilla. There was a good fit between *Hyal1* and *Hyal2* transcriptional level and changes in hyaluronidase activity in the renal tissue. It was suggested that vasopressin is able to inhibit the synthesis of hyaluronan and concomitantly

promotes its degradation in the renal papilla interstitium, thereby facilitating water flow between elements of the renal countercurrent system. The implications for this effect are discussed in the context of the literature data.

Key words: vasopressin; kidney; hyaluronan; hyaluronansynthase-2; hyaluronidase-1, 2; gene expression; water reabsorption.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Иванова Л.Н., Бабина А.В., Батурина Г.С., Каткова Л.Е. Влияние вазопрессина на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма гиалуронана интерстициальной ткани, и на концентрирующую функцию почки крыс WAG. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):234-242. DOI 10.18699/VJ16.138

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ivanova L.N., Babina A.V., Baturina G.S., Katkova L.E. Effect of vasopressin on the expression of genes for key enzymes of interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):234-242. DOI 10.18699/VJ16.138

В системе регуляции водно-электролитного гомеостаза у млекопитающих главным фактором, стимулирующим реабсорбцию воды в почке путем повышения осмотической проницаемости эпителия дистальных канальцев, является нейрогипофизарный гормон вазопрессин. Открытие аквапоринов, водных каналов клеточных мембран, отмеченное в 2003 г. Нобелевской премией (Agre, 1997, 2004), послужило основой прогресса в изучении молекулярных механизмов действия гормона. Согласно современным представлениям, вазопрессин, связываясь со специфическими рецепторами базальной мембраны главных клеток эпителия собирательных трубок, индуцирует цепь реакций, включающих в качестве главного звена транслокацию аквапоринов в апикальную мембрану клетки, и увеличение ее проницаемости (Nielsen et al., 2001; Noda, Sasaki, 2005; Rinschen et al., 2010). Помимо быстрого эффекта, развивающегося в течение нескольких минут, вазопрессин оказывает долговременное действие на проницаемость собирательных трубок на геномном уровне, стимулируя биосинтез аквапоринов (Ecelbarger et al., 1996; Uawithya et al., 2008). Несмотря на успех, достигнутый в последние годы в изучении клеточных механизмов действия вазопрессина, многие вопросы регуляции концентрирующей функции почек остаются нерешенными. Процесс осмотического концентрирования достигает максимального уровня в зоне внутреннего мозгового вещества – сосочке почки. В этой зоне барьер для диффузии воды из собирательных трубок в кровотоки представлен не только эпителием, но также плотным внеклеточным матриксом, разделяющим элементы концентрирующего противоточного механизма. Основным компонентом внеклеточного матрикса является гиалуронан (гиалуриновая кислота, ГК) – линейный отрицательно заряженный гликозаминогликан, построенный из повторяющихся дисахаридных единиц Д-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина (Comper, Laurent, 1978; Lee, Spicer, 2000). В почке млекопитающих распределение ГК гетерогенно: высокая концентрация характерна для внутренней зоны мозгового вещества, в то время как в корковом веществе содержание ГК в десятки раз ниже (Ivanova et al., 1982; Rügheimer et al., 2008). В высокополимерном состоянии ГК обладает уникальной способностью формировать трехмерный гель, связывать большие объемы воды и положительно заряженные

ионы, и это свойство может влиять как на диффузию воды и растворов в медулле почки, так и на поддержание концентрационного градиента (Day, 1952; Hedbys, 1963; Preston et al., 1965; Pinter, Shohet, 2009). Благодаря высокой вязкости ГК также может обладать функцией механо-осмотического преобразователя, конвертирующего энергию перистальтического сокращения гладких мышц почечной лоханки в аксиальный осмотический градиент в сосочке (Knepper et al., 2003; Pinter, Shohet, 2009).

А.Г. Гинецинским в 1958 г. была предложена гипотеза о вовлечении гиалуронидазы в механизм действия вазопрессина на реабсорбцию воды в почке (Ginetzinsky, 1958). В пионерских работах его лаборатории было найдено, что гиалуронидазная активность мочи нарастает при дегидратации и введении препаратов нейрогипофизарного гормона и падает практически до нуля при водной нагрузке. При этом гистохимически выявляются существенные изменения состояния интерстициального матрикса и межклеточных контактов в эпителии собирательных трубок (Иванова, 1958; Закс, Титова, 1959; Наточин, 1959; Иванова, Виноградов, 1962). Интерес к «гиалуронидазной гипотезе» возобновился в последние годы в связи с появлением новых данных о большой зависимости гиалуронидазной активности и содержания ГК в почке от интенсивности осмотического концентрирования и уровня вазопрессина в крови (Ivanova, Melidi, 2001; Harada, Takahashi, 2007; Rügheimer et al., 2008). Однако вопрос о молекулярных механизмах вовлечения ГК интерстициального матрикса в эффект вазопрессина на транспорт воды в почке остается дискуссионным и требует дальнейших исследований (Pinter, Shohet, 2009; Stridh et al., 2012).

Гетерогенность распределения ГК по функциональным зонам почки и изменение его концентрации при смене водного режима, по-видимому, могут быть объяснены различной интенсивностью биосинтеза этого полисахарида или его деградации. У млекопитающих идентифицированы три изоформы гиалуронан-синтазы, осуществляющие биосинтез ГК – HAS1, 2 и 3 (Spicer, McDonald, 1998). В почке крыс обнаружена экспрессия всех трех ферментов (Rügheimer et al., 2009). По-видимому, наиболее существенный вклад в содержание ГК вносит HAS2, для которой характерны продукция полимера максимальной длины и большая скорость полимеризации (Itano, Kimata, 1996; Jacobson et al., 2000; Bartolo,

Donald, 2007). В деградации ГК в соматических тканях млекопитающих основную роль играют лизосомальные гидролазы: гиалуронидаза 1-го типа, β -глюкуронидаза и β -N-ацетилглюкозаминидаза и гиалуронидаза 2-го типа, фиксированная на плазматической мембране клеток (Csoka et al., 2001; Jedrzejewski, Stern, 2005; Harada, Takahashi, 2007). HYAL2 функционирует внеклеточно, гидролизует ГК с преимущественным образованием крупных остатков порядка 20–50 кДа, которые интернализуются в клетку и гидролизуются далее лизосомальными ферментами (Stern, 2003; Ericsson, Stern, 2012). В настоящем исследовании проведен анализ действия вазопрессина на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты обмена ГК, в различных зонах почки крыс WAG в сопоставлении с показателями почечной функции.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Работа проведена на половозрелых крысах линии WAG весом 200–250 г, выращенных в ЦКП «Виварий конвенциональных животных» ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Крыс содержали группами по четыре–шесть особей в стандартных условиях со свободным доступом к питьевой воде и сухому корму. Исследование выполнено в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 Министерства здравоохранения от 12 августа 1977 г.), а также с международными принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

За день до эксперимента крыс помещали в индивидуальные клетки с сетчатым дном, в которых их содержали в течение всего экспериментального периода, и собирали спонтанно выделявшиеся пробы мочи для определения следующих функциональных параметров: диурез, скорость клубочковой фильтрации по клиренсу креатинина и уровень реабсорбции осмотически свободной воды ($T_{H_2O}^C$). В конце эксперимента животных анестезировали тиопенталом натрия (10 мг/кг веса тела, внутривенно) и после декапитации забирали пробы крови и образцы почечной ткани. Концентрацию креатинина в плазме крови и моче измеряли спектрофотометрически (PD 303 UV, Arel, Япония). Осмоляльность мочи и плазмы крови определяли криоскопическим способом (миллиосмометр МТ-2, Россия). Расчет почечных функций проводили по стандартным формулам.

Дизайн эксперимента. Все животные были разделены на три группы:

1) контрольные крысы ($n = 4$) содержались на стандартном корме со свободным доступом к питьевой воде; животным этой группы вводили физиологический раствор (0,5 мл внутривенно, дважды в день) в течение двух дней;

2) гидратированные крысы ($n = 4$); животных в течение двух дней лишали стандартного корма, но они имели свободный доступ к гипотоническому 4 %-му раствору сахарозы, в данных условиях потребление которого крысами достигало 60–70 % от массы тела в день; животные гидратировались и секреция эндогенного вазопрессина подавлялась;

3) крысы ($n = 4$) с введением селективного агониста V_2 -рецепторов вазопрессина (дезамино-Cys1,D-Arg8-вазопрессин, dDAVP, Sigma, США); препарат вводили внутривенно дважды в день в течение двух дней в дозе 100 мкг/кг массы тела; животных содержали на стандартном корме со свободным доступом к питьевой воде.

Оценка экспрессии мРНК генов в почке крыс. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих ферменты метаболизма ГК (*Has2*, *Hyal1*, *Hyal2*), определяли в коре и внутреннем мозговом веществе почки методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Образцы тканей почки, взятые на холоде сразу после декапитации животных, помещали в стерильные пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до выделения РНК. Тотальную РНК из тканей почек получали с использованием набора реагентов Aurum Total RNA Mini kit (Bio-Rad, США) на колонках согласно прилагаемому протоколу. Концентрацию РНК в полученном образце измеряли на спектрофотометре Eppendorf BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия). Чистоту определяли по соотношению оптических плотностей образца, измеренных при 260 и 280 нм; в работе использованы пробы с коэффициентом более 1,8.

Для проведения обратной транскрипции смешивали 2 мкг тотальной РНК в 20 мкл реакционной смеси, в которую входили: 200 единиц обратной транскриптазы М-MLV RT (Биосан, Новосибирск, Россия), 0,1 мМ олиго-dT 18 праймеры (Биосинтез, Новосибирск, Россия), 1 $\times$ MLV RT буфер (Promega, США), 3,5 мМ dNTP (Сибэнзим, Новосибирск, Россия), 5 мМ дитиотреитол (DTT, Sigma, США), 20 единиц ингибитора рибонуклеаз (Fermentas, Литва). В негативном контроле вместо РНК добавляли аликвоту бидистиллированной воды. Смесь инкубировали 60 мин при 42°C , реакция прерывалась инактивацией ферментов в течение 10 мин при 95°C . Работа выполнена в амплификаторе БИС (Россия). Полученную кДНК хранили при -20°C .

ПЦР в реальном времени проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2,5 мкл кДНК и 22,5 мкл смеси, состоящей из 2,5 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, 10-кратного ПЦР буфера, 25 мМ MgCl_2 , 5 Е/мкл Taq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами, деионизированной воды (Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green, Синтол, Россия), смеси 12,5 пкмоль прямого и обратного праймеров (Биосинтез, Новосибирск, Россия). В негативном контроле вместо кДНК добавляли бидистиллированную воду. Амплификацию проводили в системе CFX96 real-time PCR (BioRad, США) по следующей схеме: 1) денатурация $95^\circ\text{C} - 5$ мин; 2) денатурация $95^\circ\text{C} - 10$ с, отжиг при оптимальной температуре для выбранных праймеров (60°C) – 30 с, элонгация $72^\circ\text{C} - 20$ с, 39 циклов; 3) определение кривых плавления продуктов амплификации в диапазоне температур от 65 до 95°C при шаге в $0,5^\circ\text{C}$ для подтверждения специфичности амплификации и отсутствия димерных праймеров. Ген-специфичные праймеры представлены в табл. 1, подбор проводили таким образом, чтобы соответствующие фрагменты геномной ДНК содержались внутри одного экзона.

Table 1. Primers for real-time RT-PCR and amplicon sizes

Gene	Primer sequence	Amplicon length, bp
<i>Has2</i>	F: 5'-CTCCGAGAGTGGCTATACAATGC-3'	210
	R: 5'-GCGAAAGACGACTTGATGAGACC-3'	
<i>Hyal1</i>	F: 5'-TCGGACCCTTTATCCTGAAC-3'	262
	R: 5'-TTCTTACACCACTCTCCACTC-3'	
<i>Hyal2</i>	F: 5'-TCAGTGACGCTTCAAGTATGGA-3'	181
	R: 5'-GACTGAGGTGCAAGAAGGTACTG-3'	
<i>HPRT1</i>	F: 5'-AGTTTGTGTTGGATATGCCCTTG-3'	126
	R: 5'-TGATGATTCAACTTGCCGCTGTC-3'	

Количественную оценку уровня экспрессии мРНК изучаемых генов проводили по отношению к экспрессии гена «домашнего хозяйства» гипоксантинфосфорибозилтрансферазы-1 (*HPRT1*), который служил внутренним стандартом обратной транскрипции. После проведения ОТ-ПЦР данные анализировали в пакете программ CFX Manager Software ver. 1.5 (Bio-Rad, США). Каждое измерение выполняли в трех повторностях и нормировали относительно экспрессии гена *HPRT1* с использованием стандартного метода (Bookout et al., 2006).

После проведения ПЦР продукты амплификации идентифицировали при помощи электрофореза с использованием 1 %-го этидиум бромид (Медиген, Новосибирск, Россия) в 1,8 %-м агарозном геле (агароза – Sigma, США) с 1 × TBE буфером (разбавление TBE × 10, включающего 108 г трис, 54 г борной кислоты, 20 мл 1М ЭДТА, дистиллированная вода – до 1 л). Идентификацию проводили относительно ДНК-маркеров (Fermentas, Литва). Электрофорез осуществляли при напряжении 120 В в течение 30 мин в аппарате для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия), гель фотографировали фотокамерой Olympus в ультрафиолетовом свете (300 нм) на трансиллюминаторе (рис. 1). Каждая пара праймеров давала одну полосу продукта ожидаемого размера.

Определение активности гиалуронидазы в ткани почки. Для определения гиалуронидазной активности в пробах крови и растворах гомогенатов коры и сосочка почки использовали флюориметрический метод Моргана–Эльсона в модификации Такахаша (Takahashi et al., 2003) в условиях трехчасового гидролиза при 37 °С по конечному продукту – N-ацетилглюкозамину (GlcNAc). Активность сопутствующих экзогидролаз в реакционной смеси ингибировали 0,02 М раствором слизиной кислоты. Флюоресценцию измеряли на флюорате-2М (ЛЮМЭКС, Россия) при волне возбуждения 545 нм и эмиссии – 602 нм. За единицу активности гиалуронидазы принимали количество фермента, необходимого в данных условиях реакции для образования одного мкмоль конечного глюкозамина за одну минуту. Соответствующая калибровочная кривая ставилась с известными концентрациями N-ацетилглюкозамина.

Измерение содержания гиалуронана в ткани почки. Образцы почечной коры и сосочка замораживали в жидком азоте, измельчали и выдерживали в смеси этанола и эфира, высушивали и взвешивали. Гиалуронан экстрагировали в 0,5 М NaOH в течение 15 ч при 4 °С. После центрифугирования (2000 g, 20 мин, 4 °С) супернатант анализировали, используя набор ELISA (Echelon Bioscience Inc., США).

Гистохимическое выявление гиалуронана. Светооптическое исследование выполнено на уровне коры почки и средней трети сосочка почки, содержащей структуры, ответственные за осмотическое концентрирование. Для подготовки блоков к проведению гистохимического анализа содержания гиалуроновой кислоты от почки после извлечения отсекали полюса; полученный фрагмент, включающий все зоны почки, помещали в 12 %-й фор-

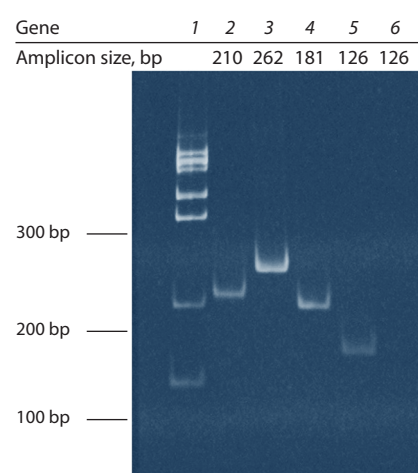


Fig. 1. Analysis of amplicates of genes under study *Has2*, *Hyal1*, *Hyal2*; the *HPRT1* housekeeping gene; and the negative PCR control.

Lanes: 1, DNA molecular weight ladder; 2, *Has2*; 3, *Hyal1*; 4, *Hyal2*; 5, *Hprt1*; 6, *Hprt1* (no RT).

малин на 48 ч. Далее осуществляли обезживание и заливку ткани в среду Histomix (БиоВитрум, Россия) по стандартным методикам. Срезы готовили на санном микротоме Microm HM430 (Microm International GmbH, Германия) толщиной 5 мкм. Окрашивание для специфического выявления кислых гликозаминогликанов производили алциановым синим (БиоВитрум, Россия), использовали 1 %-й раствор красителя при pH 2,5 в течение 3 мин. Для того чтобы избежать появления артефактов окраски, срезы контрольных и опытных групп окрашивали одновременно. Препараты изучали под световым

Table 2. Effects of hydration and dDAVP administration on renal functions

Renal function	Experimental series		
	Control	Hydration	dDAVP administration
Urine formation rate, ml/h/100 g body wt	0.15 ± 0.02	1.2 ± 0.3***	0.23 ± 0.04
Glomerular filtration rate (creatinine clearance), ml/h/100 g body wt	10.8 ± 2.0	12.9 ± 1.4	9.7 ± 1.4
Urine osmolality, mOsm/kg H ₂ O	1709 ± 85	61 ± 14***	2300 ± 105**
Plasma osmolality, mOsm/kg H ₂ O	311 ± 17	298 ± 16	301 ± 28
Osmotically free water reabsorption, ml/h/100 g body wt	+1.29 ± 0.22	-0.7 ± 0.014***	+1.52 ± 0.21

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control rats.

микроскопом Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива $\times 63$. Снимки препаратов выполнены с использованием цифровой фотонасадки AxioCam MRC (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных. Достоверность различий в изучаемых группах оценивали по t -критерию Стьюдента для парных сравнений. Для сравнения независимых выборок анализ достоверности различий проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Статистическую обработку проводили в пакете программ Statistica (StatSoft, США). Достоверными признавали различия при $p \leq 0,05$. Приведенные в работе данные представлены в виде: среднее $\pm$ ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Результаты

Оценка параметров почечной функции. Для животных разных экспериментальных групп были характерны существенные различия концентрирующей функции почек (табл. 2). Контрольные крысы экскретировали гипертоническую мочу. Обильное питье гипотонического 4 %-го раствора сахарозы в течение двух дней приводило к возрастанию скорости мочеобразования и резкому снижению осмоляльности экскретируемой мочи, обусловленному торможением реабсорбции осмотически свободной воды. Осмоляльность плазмы крови в данной экспериментальной группе не отличалась от контроля. Очевидно, это связано с перераспределением жидкости между компартментами в условиях гидратации. Введение dDAVP в течение двух дней индуцировало существенное возрастание реабсорбции осмотически свободной воды, и осмоляльность мочи достигала максимальных значений. Существенных различий скорости клубочковой фильтрации, измеренной по клиренсу креатинина, между экспериментальными группами не наблюдалось.

Уровень экспрессии генов ферментов метаболизма гиалуронана. При проведении ОТ-ПЦР в реальном времени было обнаружено, что мРНК гена *Has2* экспрессируется в коре и внутреннем мозговом веществе почки (рис. 2, а). Снижение реабсорбции осмотически свободной воды после двухдневной гидратации сопровождалось повышением экспрессии мРНК гена *Has2* во внутреннем мозговом веществе почки по сравнению с контролем.

В коре почки гидратированных крыс наблюдалось увеличенное содержание мРНК *Has2*, но в этой зоне прирост был значительно меньше, чем во внутреннем мозговом веществе. Введение селективного агониста V_2 -рецепторов вазопрессина (dDAVP) приводило к снижению экспрессии *Has2* в коре почки по сравнению с контролем и группой гидратации, однако наиболее резкие различия содержания мРНК *Has2*, по сравнению с группой гидратации, отмечались во внутреннем мозговом веществе.

Содержание мРНК гена *Hyal-1* в коре почки достоверно не изменялось в условиях гидратации или введения dDAVP (рис. 2, б). Однако во внутреннем мозговом веществе при введении dDAVP выявлено существенное увеличение уровня экспрессии мРНК *Hyal-1*.

Тенденция к нарастанию уровня экспрессии мРНК гена *Hyal-2* наблюдалась в коре почки в условиях введения dDAVP (рис. 2, в). При этом гидратация гипотоническим раствором сахарозы вызвала достоверное снижение содержания мРНК *Hyal-2* в коре почки. По сравнению с контролем существенные изменения обнаружены во внутреннем мозговом веществе: достоверное уменьшение уровня экспрессии мРНК *Hyal-2* в условиях гидратации и значительное возрастание – при введении dDAVP. Низкое содержание мРНК *Hyal-2* в коре и внутреннем мозговом веществе почки гидратированных крыс коррелировало с наименьшей по сравнению с другими группами осмоляльностью экскретируемой мочи.

Активность гиалуронидазы в тканях почки. При определении гиалуронидазной активности в экстрактах коры почки не выявлено достоверных различий между экспериментальными группами (табл. 3). Активность гиалуронидазы во внутреннем мозговом веществе во всех группах была существенно выше по сравнению с корой. В условиях гидратации наблюдалось снижение гиалуронидазной активности во внутреннем мозговом веществе почки. Напротив, введение dDAVP вызвало достоверное возрастание активности фермента в ткани внутреннего мозгового вещества почки. Выявлена положительная корреляция между осмоляльностью мочи и активностью гиалуронидазы во внутреннем мозговом веществе почки ($r = 0,85$, $p < 0,05$).

Распределение гиалуронана в почке. В почке крыс WAG выявлено гетерогенное распределение ГК (табл. 3),

характеризующееся наименьшим содержанием ГК в коре всех экспериментальных групп. Во внутреннем мозговом веществе почки в условиях гидратации происходило достоверное возрастание содержания ГК. Действие dDAVP приводило к уменьшению содержания ГК во внутреннем мозговом веществе почки на 76 % по сравнению с гидратированными крысами. Результаты количественного распределения ГК согласуются с гистохимическим выявлением в почке исследованных животных (рис. 3). При светооптическом изучении срезов, окрашенных алциановым синим, не выявлено различий гистохимического окрашивания ГК в корковом веществе всех экспериментальных групп. В средней трети внутреннего мозгового вещества почки наиболее интенсивным было окрашивание ГК интерстициального пространства у гидратированных крыс (рис. 3, б), в то время как в группах контроля и введения dDAVP, характеризующихся высокими показателями эффективности осмотического концентрирования мочи, обнаружено менее интенсивное окрашивание интерстициального пространства (рис. 3, а, в).

Обсуждение

Был изучен эффект аналога вазопрессина, селективного агониста V_2 -рецепторов, dDAVP, на экспрессию генов *Has2*, *Hyal1* и *Hyal2*, кодирующих ключевые ферменты, вовлеченные в обмен ГК в почке крыс WAG. Обнаружено, что содержание мРНК *Has2* было наибольшим во внутреннем мозговом веществе (сосочке почки) в условиях подавления секреции эндогенного вазопрессина у крыс WAG гидратацией. Введение в течение двух дней dDAVP ассоциировалось с существенным снижением содержания мРНК *Has2* в сосочке почки. Наблюдались четкие обратные отношения между экспрессией *Has2* в сосочке и реабсорбцией осмотически свободной воды. Повышенная транскрипция *Has2* при низком уровне вазопрессина в крови может свидетельствовать об усиленной продукции ГК, что подтверждалось нарастанием содержания ГК в почечной ткани и усилением интенсивности окрашивания структур интерстициального матрикса.

Введение крысам аналога вазопрессина приводило к снижению содержания ГК в интерстиции сосочка, что может быть не только следствием подавления биосинтеза полимера, но также усилением его катаболизма. Соответственно полученным результатам, гены *Hyal1* и *Hyal2* экспрессируются во всех функциональных зонах почки. В условиях действия dDAVP не наблюдалось существенного повышения экспрессии мРНК генов *Hyal1* и *Hyal2* и гиалуронидазной активности в корковом веществе почки по сравнению с контрольными животными, в то время как в области сосочка почки экспрессия этих генов и ферментативная активность значительно нарастали. На основании полученных данных невозможно выявить, какая именно форма гиалуронидазы вызывает повышение измеряемой гиалуронидазной активности ткани сосочка почки. Тем не менее отмечалась хорошая корреляция между изменением гиалуронидазной активности в тканевых экстрактах и транскрипционными событиями. В результате имело место повышение деградации ГК интерстиция, окружающего собирательные трубки, сегменты петель Генле и прямые сосуды, образующие пучки в мозговом

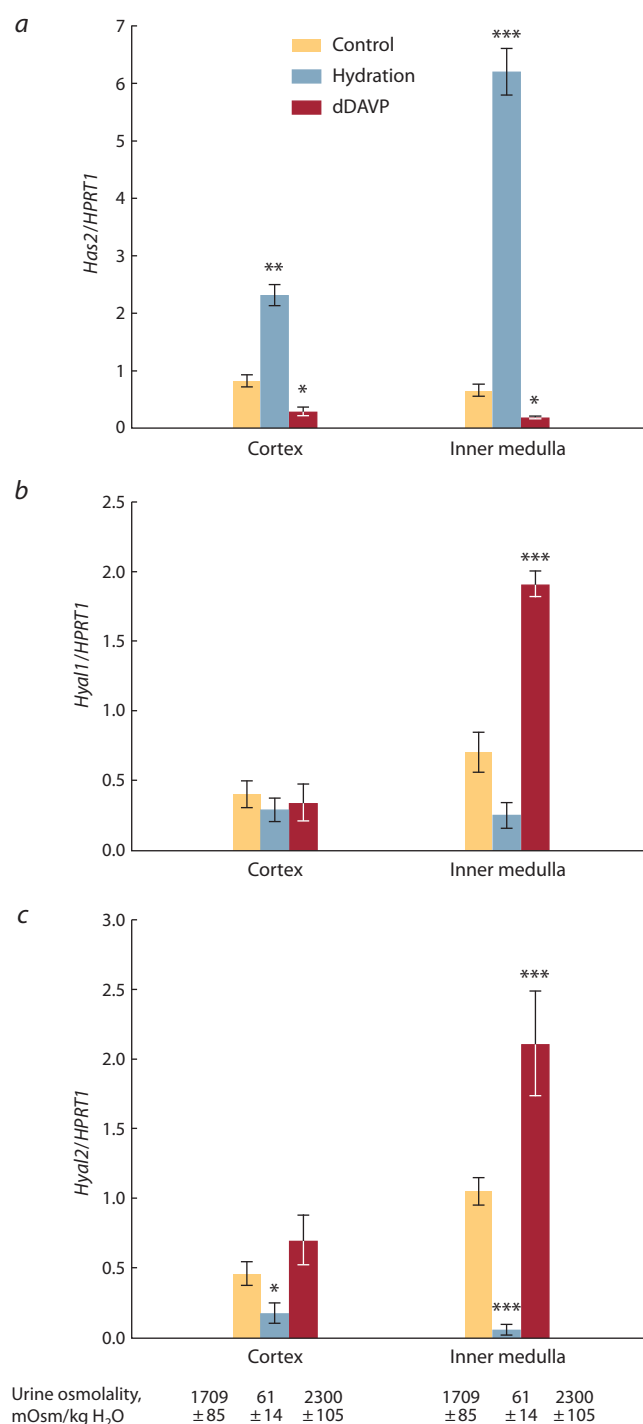


Fig. 2. Expression of mRNAs under study in the renal cortex and inner medulla of WAG rats: (a) hyaluronan synthase 2, (b) hyaluronidase 1, (c) hyaluronidase 2.

Expression of the *Has2* (a), *Hyal-1* (b), *Hyal-2* (c) genes is given relative to the *HPRT1* housekeeping gene. Data are shown as $M \pm SEM$. Significant differences from controls according to Student's *t* test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Table 3. Effect of hydration and dDAVP administration on the content and Hyal activity in renal tissues

Experimental series	Hyaluronan content (mg/g dry wt)		Hyaluronidase activity (mcg GlcNAc/h/mg of protein)	
	Cortex	Papilla	Cortex	Papilla
Control	0.71 ± 0.05	7.9 ± 0.8 ^{vv}	15.1 ± 1.2	51.2 ± 4.9 ^{vv}
Hydration	0.88 ± 0.21	13.6 ± 0.1 ^{vvv ***}	14.5 ± 3.6	30.2 ± 5.5 ^{vvv **}
dDAVP administration	0.69 ± 0.12	3.29 ± 0.24 ^{vvv *}	18.9 ± 3.5	75.5 ± 6.4 ^{vvv *}

p* < 0.05; *p* < 0.01; ****p* < 0.001 compared to control; ^{vv}*p* < 0.01; ^{vvv}*p* < 0.001 compared to renal cortex.

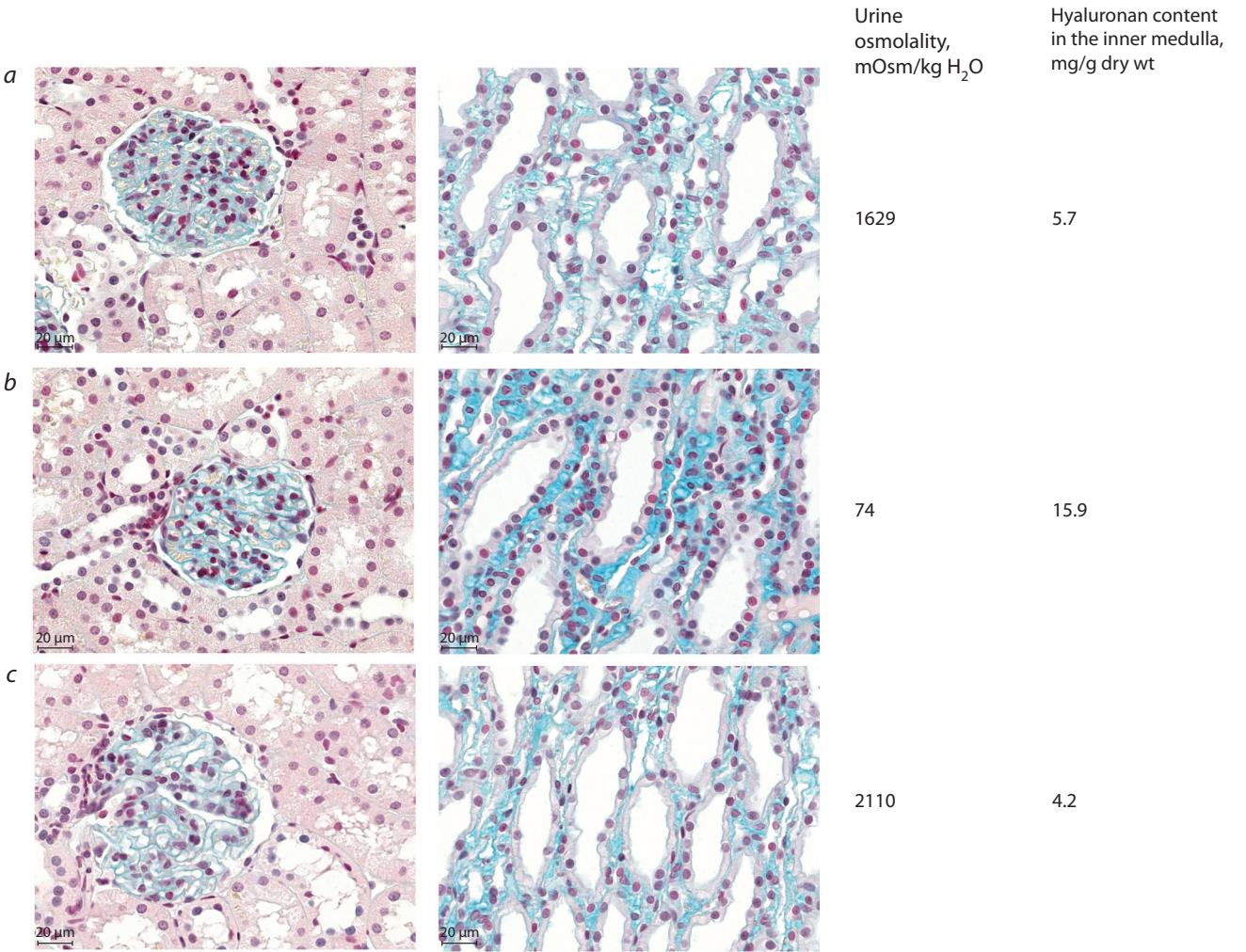


Fig. 3. Histochemical visualization of hyaluronan in the renal cortex and inner medulla of WAG rats. *a*, control; *b*, hydration; *c*, dDAVP treatment. Lens magnification ×63.

веществе почки. Предполагается, что гидролиз ГК в сосудистых пучках сосочка не только приводит к снижению вязкости интерстиция, но и сближает почечные канальцы и сосуды, вследствие чего укорачивается диффузионная дистанция между элементами концентрирующей системы почки и это способствует созданию осмотического градиента противоточной умножительной системой (Bartolo, Donald, 2007; Stridh et al., 2012).

Соответственно предыдущим исследованиям, двухчасовая гидратация, вызванная инфузией гипотонического раствора сахарозы, приводила к нарастанию содержания ГК в почечном сосочке крыс Спрэг-Доули, но при этом не регистрировалось нарастания транскриптов *Has2* и снижения транскриптов *Hyal1-4* (Hansell et al., 2000; Rügheimer et al., 2009). С точки зрения авторов, быстрое повышение ГК интерстиция за время двухчасовой гидра-

тации происходит без вовлечения изменений экспрессии генов и их вклада в продукцию и расщепление ГК, они предполагают, что нарастание ГК – следствие изменения активности гиалуронидазы. В то же время в их работе наблюдалась корреляция между снижением содержания ГК и уменьшением *Has2* транскрипции в сосочке почки после 24-часовой дегидратации. В нашем исследовании при пролонгированной гидратации (два дня) продемонстрированы как повышение экспрессии гена *Has2* с одновременным снижением экспрессии гена *Hyal2*, так и снижение гиалуронидазной активности в ткани сосочка. В экспериментах с введением аналога вазопрессина в течение двух дней у крыс WAG экспрессия гена *Has2* резко редуцировалась и одновременно повышалась экспрессия генов *Hyal1-2*. Таким образом, направленность изменений содержания ГК и гиалуронидазной активности в медуллярной зоне, которые наблюдались нами в экспериментах на крысах WAG, совпадает с тем, что получено ранее на крысах Спрэг-Дули (Hansell et al., 2000; Rügheimer et al., 2009). Расхождение литературных данных с нашими результатами в отношении экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма ГК, может быть объяснено различиями экспериментального дизайна и длительностью эксперимента.

В сосочке почки вазопрессин может оказывать также непрямой эффект на активность гиалуронидазы благодаря изменению концентраций мочевины и натрия в интерстициальной среде. В сосочке почки крыс концентрация мочевины варьирует от 0,3 (во время водной нагрузки) до 1,0 М (при дегидратации), а натрия – от 0,15 до 0,4 М (Bulger, 1987). Кривая начальной скорости реакции гидролиза ГК ферментами, изолированными из почечного сосочка, показала, что концентрации мочевины и натрия, характерные для гидратации и длительно-го эффекта вазопрессина, являются оптимальными для активности гиалуронидазы. В то же время концентрации выше или ниже оптимума оказывают ингибирующий эффект на ферментную активность (Ivanova et al., 1985). Х.Л. Брукс с коллегами (Brooks et al., 2003) наблюдали различные ответы генов на dDAVP в корковой и медуллярной зонах почки крыс Браттлборо, лишенных эндогенного вазопрессина. Авторы предположили, что долговременный эффект dDAVP может состоять из прямого и непрямого действия гормона на экспрессию генов. Непрямое действие может проявляться благодаря вазопрессин-индуцированным изменениям локальной осмоляльности и концентрации ионов. Наша гипотеза о регуляции активности гиалуронидазы в папиллярной зоне мочевиной и натрием согласуется также с наблюдениями, сделанными на бесклеточной среде, в которой был выявлен ингибирующий эффект низкой ионной силы на катализируемый гиалуронидазой гидролиз ГК (Asteriou et al., 2006). Сравнение данных предшествующих работ с результатами настоящего исследования подтверждает, что вазопрессин ускоряет катаболизм ГК в медуллярной зоне почки, при этом вовлекаются различные механизмы: вазопрессин повышает биосинтез ферментов HYAL1 и HYAL2 путем стимуляции экспрессии соответствующих генов и ускоряет деградацию ГК вследствие активации ферментов мочевиной и ионами натрия, концентрация

которых повышается в условиях антидиуреза. Дальнейшее изучение необходимо для проверки этой гипотезы.

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что изменение экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты обмена ГК интерстициальной ткани почки, вовлекается в эффект вазопрессина на реабсорбцию воды. Одновременно с повышением числа аквапоринов в клеточной мембране вазопрессин способен ингибировать синтез ГК интерстиция в мозговом веществе почки и вместе с этим стимулировать его деградацию. Это приводит к снижению содержания ГК в медуллярном интерстиции и облегчает диффузию воды между канальцами и сосудами концентрирующей системы почки. Вопрос о молекулярных механизмах эффекта вазопрессина на активность генов катаболизма ГК остается открытым.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004 and the Russian Foundation for Basic Research, project 10-04-01280.

The authors are grateful to the staff of the Vivarium of conventional animals, Institute of Cytology and Genetics, for providing experimental animals.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agre P. Molecular physiology of water transport: aquaporins. *Biol. Cell.* 1997;89:255-257.
- Agre P. Nobel lecture. Aquaporin water channels. *Biosci. Rep.* 2004;24:127-163.
- Asteriou T., Vincent J.C., Tranchepain F., Deschrevel B. Inhibition of hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase at high substrate concentration and low ionic strength. *Matrix Biol.* 2006;25:166-174.
- Bartolo R.C., Donald J.A. The distribution of renal hyaluronan and the expression of hyaluronan synthases during water deprivation in the *Spinifex* hopping mouse. *Notomys alexis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol.* 2007;148:853-860.
- Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2006;Chapter 15:Unit 15.8.
- Brooks H.L., Ageloff S., Kwon T.-H., Brandt W., Terris J.M., Seth A., Michea L., Nielsen S., Fenton R., Knepper M. cDNA array identification of genes regulated in rat renal medulla in response to vasopressin infusion. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2003;284:F218-F228.
- Bulger R.E. Composition of renal medullary tissue. *Kidney Int.* 1987;31:556-561.
- Comper W.D., Laurent T.C. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.* 1978;58:265-315.
- Csoka A.B., Frost G.I., Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* 2001;20:499-508.
- Day T.D. The permeability of the interstitial connective tissue and the nature of the interfibrillary substance. *J. Physiol.* 1952;177:1-8.
- Ecelbarger C.A., Chon C.L., Lolait S.J., Knepper M.A., DiGiovanni S.R. Evidence for dual signaling pathways for V₂ vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 1996;270:623-633.
- Ericsson M., Stern R. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem. Res. Int.* 2012. DOI 10.1155/2012/893947
- Ginetzinsky A.G. Role of hyaluronidase in the reabsorption of water in renal tubules (The mechanism of action of antidiuretic hormone). *Nature.* 1958;182:1218-1219.

- Hansell P., Göransson V., Odland C., Gerdin B., Hallgren R. Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration. *Kidney Int.* 2000;58:2061-2068.
- Harada H., Takahashi M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 2007;282:5597-5607.
- Hedbys B.O. Corneal resistance to the flow of water after enzymatic digestion. *Exptl. Eye. Res.* 1963;2:112-121.
- Itano N., Kimata K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* 1996;271:9875-9878.
- Ivanova L.N. To the question on hyaluronidase role in urine production. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*=*Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 1958;45:22-27.
- Ivanova L.N., Goryunova T.E., Nikiforovskaya L.F., Tishchenko N.I. Hyaluronate hydrolase activity and glycosaminoglycans in the Brattleboro rat kidney. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982;394:503-508.
- Ivanova L.N., Goryunova T.E., Nikiforovskaya L.F., Tishchenko N.I. Distribution and activity of hyaluronate hydrolases in the kidney and their reaction to ADH. Eds R. Dzurić, B. Lichardus, W. Guder. *Kidney metabolism and function.* Dordrecht:Martinus Nyhoff, 1985.
- Ivanova L.N., Vinogradov V.V. Histochemical features of renal medullar interstitial mucopolisaccharides. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*=*Archives of anatomy, histology and embryology.* 1962; 43:18-23.
- Ivanova L.N., Melidi N.N. Effects of vasopressin on hyaluronate hydrolase activities and water permeability in the frog urinary bladder. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.* 2001;443:72-77.
- Jacobson A., Brink J., Briskin M.J., Spicer A.P., Heldin P. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem. J.* 2000;348:29-35.
- Jedrzejewski M.J., Stern R. Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. *Proteins.* 2005;61: 227-238.
- Knepper M.A., Saidel G.M., Hascall V.C., Dwyer T. Concentration of solutes in the renal inner medulla: interstitial hyaluronan as a mechanoosmotic transducer. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2003;284: 433-446.
- Lee J.Y., Spicer A.P. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin Cell. Biol.* 2000;12:581-588.
- Natochin Y.V. Hyaluronidase secretion in the kidney of different vertebrates. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*=*Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 1959;48:10-16.
- Nielsen S., Frokier J., Marples D., Kwon T.-H., Agre P., Knepper M. Aquaporins in the kidney: from molecules to Medicine. *Physiol. Rev.* 2001;82:205-244.
- Noda Y., Sasaki S. Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2. *Biol. Cell.* 2005;97:885-892.
- Pinter G.G., Shohet J.L. An inner medullary concentrating process activated by renal pelviccalyceal muscle contractions: assessment and hypothesis. *J. Nephron. Physiol.* 2009;113:1-6.
- Preston B.N., Davies M., Ogston A.G. The composition and physicochemical properties of hyaluronate acids prepared from ox synovial fluid and from mesothelioma. *Biochem. J.* 1965;96:449-471.
- Rinschen M.M., Yu M.-J.G., Boja J.D., Hoffert T., Pisitkun T., Knepper M.A. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals vasopressin V2-receptor – dependent signaling pathway in renal collecting duct cells. *PNAS.* 2010;107:3882-3887.
- Rügheimer L., Johnsson C., Maric C., Hansell P. Hormonal regulation of renomedullary hyaluronan. *Acta Physiol.* 2008;193:191-198.
- Rügheimer L., Olerud L., Johnsson C., Takahashi T., Shimizu K., Hansell P. Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *J. Matrix Biol.* 2009;28:390-395.
- Spicer A.P., McDonald J.A. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J. Biol. Chem.* 1998;273:1923-1932.
- Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology.* 2003;13:105R-115R.
- Stridh S., Palm F., Hansell P. Renal interstitial Hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012;302:R1235-R1249.
- Takahashi T., Ikegami-Kawai M., Okuda R., Susuki K. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. *Anal. Biochem.* 2003;322:257-261.
- Uawithya P., Pisitkun T., Ruttenberg B.E., Knepper M.A. Transcriptional profiling of native inner medullary collecting duct cells from rat kidney. *Physiol. Genomics.* 2008;32:229-253.
- Zaks M.G., Titova M.M. Histological and histochemical changes in rat kidney under hydration and antidiuresis. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*=*Archives of anatomy, histology and embryology.* 1959;37:19-24.



Особенности роста карциносаркомы Walker 256 у крыс линий Brattleboro и ISIAH (НИСАГ)

И.И. Хегай

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

Исследована динамика роста перевиваемой линейнонеспецифической карциносаркомы Walker 256 у крыс, моделирующих наследственные системные патологические процессы. У крыс линии Brattleboro развивается гипоталамический несахарный диабет на фоне абсолютного отсутствия вазопрессина в крови. Вследствие гормонального дисбаланса нарушается регуляция водно-электролитного обмена. Крысы линии ISIAH (НИСАГ) являются носителями генетически обусловленной стресс-индуцируемой артериальной гипертензии. Сосудистая ригидность сопровождается дополнительными плейотропными эффектами. Эксперименты выполнены на инбредных крысах линий Brattleboro и ISIAH и их гибридах (ISIAH × Brattleboro) F₁ × Brattleboro. В качестве генетических маркеров расщепления потомков использовали мутантный ген вазопрессина *di* (*diabetes insipidus*) и гены окраски шерсти, альбино (*C*) и капюшон (*h*), локализованные в трех различных группах сцепления. Альтернативные пары признаков составили: для локуса вазопрессина – суточное потребление воды более 45 либо менее 20 % от веса тела; для локуса *альбино* – сплошной белый либо иной цвет шерсти; для локуса *капюшон* – наличие либо отсутствие неравномерности окраса шерсти. Установлены два принципиально различающихся варианта динамики роста привитой опухоли. У исходно гомозиготных по гену *di* крыс родительской линии Brattleboro и гомозигот *didi*, выщепившихся в анализирующем скрещивании (ISIAH × Brattleboro) F₁ × Brattleboro, опухоль после некоторого начального роста переходила в стадию регрессии и постепенно уменьшалась вплоть до полного своего исчезновения. У выщепившихся гибридных гетерозигот *di*+ и крыс родительской линии ISIAH с генотипом нормы (++) по локусу вазопрессина опухоль росла непрерывно и завершалась только летальным исходом животных. Обнаружено, что регрессия опухоли проявляет конкордантность исключительно с генотипом *didi*, и расщепление по данному признаку не зависит от генотипа локусов *альбино* и *капюшон*. Альтернативный регрессии опухоли ее непрерывный рост наблюдается у всех крыс, имеющих хотя бы один нормально экспрессирующийся ген вазопрессина.

Ключевые слова: вазопрессин; Walker 256; регрессия опухоли; генетические маркеры; конкордантность.

Details of Walker 256 carcinosarcoma growth in Brattleboro and ISIAH lines of rats

I.I. Khgay

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The growth dynamics of transplantable Walker 256 carcinosarcoma was investigated in rats modeling inherited systemic pathological processes. Hypothalamic diabetes insipidus is developing in Brattleboro rats on the background of total vasopressin absence in the blood. Regulation of water-electrolytic metabolism is disturbed due to hormonal disbalance. ISIAH rats are carriers of inherited stress-induced arterial hypertension. Vascular rigidity is accompanied by additional pleiotropic effects. The experiments have been carried out on inbred Brattleboro and ISIAH rats, and their hybrids segregated from (ISIAH × Brattleboro) F₁ × Brattleboro mating. The mutant vasopressin gene *di* (*diabetes insipidus*) and fur painting genes, *albino* (*C*) and *hooded* (*h*), localized in three different linkage groups, were used as genetic markers of progeny splitting. Alternative pairs of traits were: daily water consumption above 45 % or lower than 20 % of body weight – for the vasopressin locus; total white or other color of fur – for the *albino* locus; presence or absence of unevenness in fur painting – for the *hooded* locus. It has been found that there are only two types of growth dynamics of grafted tumor. In the rats of the inbred Brattleboro line and in the *didi* homozygotes, which were segregated from analytical mating (ISIAH × Brattleboro) F₁ × Brattleboro, tumor began to regress and diminished until absolute disappearance after some initial growing. Heterozygous offspring *di*+ and parental ISIAH rats with the normal vasopressin genotype (++) showed permanent tumor growth until lethal injury. It was found that tumor regression demonstrates concordance exclusively to the *didi* genotype, segregation of this feature does not depend on the genotype of the *albino* or *hooded* loci. Alternative to tumor regression, permanent growth of tumor is observed in all rats having at least one normally expressed vasopressin gene.

Key words: vasopressin; Walker 256; tumor regression; genetic markers; concordance

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хегай И.И. Особенности роста карциносаркомы Walker 256 у крыс линий Brattleboro и ISIAH (НИСАГ). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):243-246. DOI 10.18699/VJ16.150

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khgay I.I. Details of Walker 256 carcinosarcoma growth in Brattleboro and ISIAH lines of rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):243-246. DOI 10.18699/VJ16.150

ORIGINAL ARTICLE

Received 18.11.2015 r.

Accepted for publication 30.11.2015 r.

© AUTHOR 2016

Особенностью крыс линии Brattleboro является гипоталамический несахарный диабет, генетически запрограммированный у них вследствие делеции в гене вазопрессина и характеризующийся отсутствием секретируемого гормона в крови (Schmale, Richter, 1984). Неэкспрессирующийся мутантный аллель *di* наследуется как рецессивный по отношению к нормальному аллелю (+) гена вазопрессина (Valtin, 1982). У гомозиготных мутантов развивается несахарный диабет с постоянно высоким уровнем потребления воды, достигающим в сутки 100 % в перерасчете на вес тела (Khegai, 2002). Нами было установлено, что крысы линии Brattleboro отличаются от крыс линии WAG с физиологически нормальным метаболизмом воды также и по динамике роста трансплантированных опухолей (Хегай и др., 2006; Khegai et al., 2006; Хегай и др., 2014; Khegai et al., 2014). Для уточнения характера наследования данного ранее неизвестного признака аналогичные исследования с привлечением дополнительных генетических маркеров были проведены на крысах линии ISIAH с генетически обусловленной артериальной гипертензией.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на инбредных крысах Brattleboro, ISIAH (НИСАГ) и гибридах, полученных от анализирующего скрещивания (ISIAH × Brattleboro) $F_1 \times \times$ Brattleboro. Крысы ISIAH с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией были любезно предоставлены А.Л. Маркелем (ИЦиГ СО РАН) (Markel, 1992). Гомологичность аллельного состава генома у крыс родительских линий составляет не менее 95 % (Bender et al., 1984). В качестве маркеров расщепления потомков использовали аллели локусов вазопрессина (*di*, +) капюшонной окраски шерсти (*h*, *H*) и окраски альбино (*c*, *C*) (O'Brien, 1987). Генотипирование фенотипических классов при анализе наследования гипоталамического несахарного диабета проводили по осмоляльности экскретируемой мочи и суточному потреблению воды в стандартных условиях содержания на основании ранее установленных критериев (Khegai, 2003). Аллели генов капюшон и альбино идентифицировали по характерному дискретному проявлению на шерсти различных вариантов окраски. Все процедуры выполняли в соответствии с принятыми «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным.

Суспензию клеток линейнонеспецифической опухоли Walker 256 прививали крысам в бедренную мышцу однократно в дозе 10^6 клеток в соответствии с литературными данными (Vrionis et al., 1996). Все крысы, задействованные в эксперименте с опухолью, были привиты одинаковым образом инъекциями из свежеприготовленного препарата клеточной суспензии. Растущие солидные опухоли ежедневно измеряли, и определяли их объем. Всего было исследовано 8 крыс ISIAH, 10 – Brattleboro и 17 гибридов, выращенных в скрещивании (ISIAH × Brattleboro) $F_1 \times$ Brattleboro. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Данные по количественной оценке параметров осморегуляции, использованные при фенотипической диагностике гипоталамического несахарного диабета у индивидуальных особей в родительских линиях и у гибридных потомков, представлены в табл. 1. У крыс линии Brattleboro экскретируется гипотоничная моча относительно стандартной осмоляльности плазмы крови, дефект компенсируется высоким уровнем потребления воды. Крысы линии ISIAH демонстрируют обратное соотношение исследованных параметров, соответственно, у них отмечается выделение концентрированной мочи и естественное для животных в норме сравнительно низкое ежедневное потребление воды.

У потомков от анализирующего скрещивания наблюдалась неоднородность данных количественных признаков по сравнению с обеими родительскими линиями. У 8 из 17 гибридных особей зафиксированы примерно такие же значения исследуемых параметров осмотического концентрирования, как у крыс Brattleboro, но остальные 9 гибридов почти не отличались по этим показателям от крыс линии ISIAH. В совокупности уровень потребления воды и осмоляльность мочи позволяют с достаточной точностью генотипировать выщепляющиеся фенотипические классы относительно исходных родительских линий, и гибриды (ISIAH × Brattleboro) $F_1 \times$ Brattleboro формируют два фенотипических класса в соответствии с теоретически ожидаемым расщеплением генотипов при анализирующем скрещивании ($\chi^2 = 0,06$; $p > 0,05$). По результатам генотипирования гибриды были распределены в две экспериментальные группы, соответственно, с гетерозиготным генотипом *di* + и гомозиготным *didi*. На рисунке (а) показаны графики роста опухолей, сформировавшихся в данных группах гибридных крыс после трансплантации им клеток карциносаркомы Walker 256.

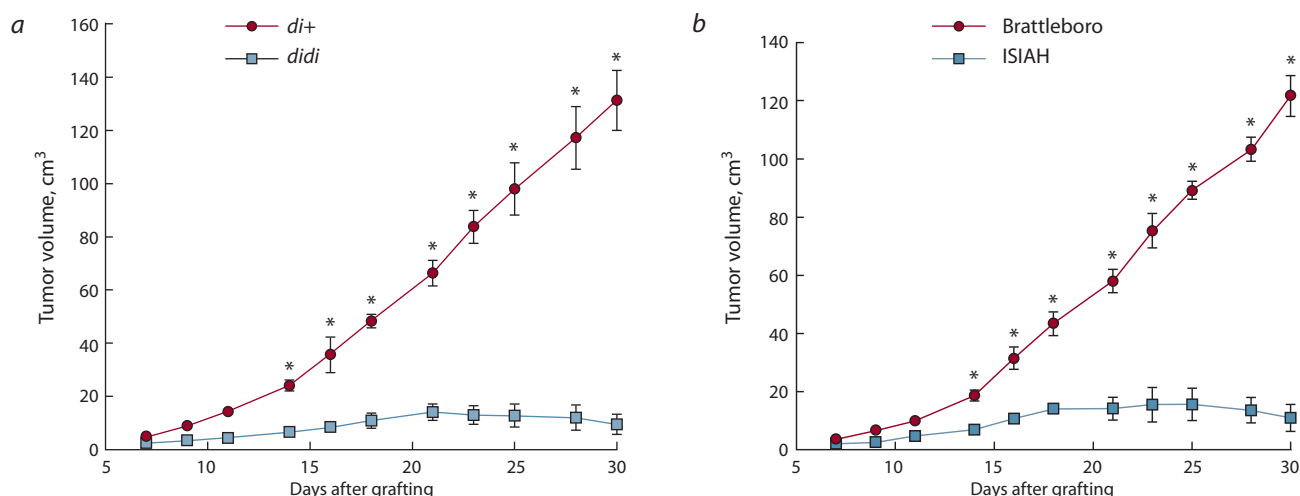
Внешние признаки опухоли в обеих группах начинают проявляться примерно через неделю после начала эксперимента, однако почти сразу соответствующие кривые роста демонстрируют различную динамику. С 14-го дня и далее до конца эксперимента у крыс регистрируют достоверные межгрупповые различия. В конечном итоге гетерозиготы *di* + и гомозиготы *didi* формируют два совершенно разных патоморфологических фенотипических класса. У гетерозиготных особей опухоль увеличивается в объеме почти прямолинейно на протяжении всего срока наблюдения и к 30-дневному сроку достигает размеров, сопоставимых с габаритами всего тела (верхняя кривая). У гомозигот опухоль изначально растет более медленными темпами, через две недели рост прекращается, опухоль переходит в стадию постепенной регрессии вплоть до полного своего исчезновения и завершается последующим выздоровлением крыс.

Рисунок (б) демонстрирует аналогичное соотношение между кривыми роста опухоли в родительских линиях Brattleboro и ISIAH при их сравнении между собой. Эти линии генетически различаются по присутствию или отсутствию нормально экспрессирующегося гена вазопрессина. Вследствие того что мутантный аллель гена

Table 1. Daily water consumption and urine osmolality

Rats	Genotype	Water consumption, % of body weight	Urine osmolality, mOsm/kg H ₂ O
Brattleboro	<i>didi</i>	72.1 ± 4.8	184 ± 19
(ISIAH × Brattleboro) F ₁ × Brattleboro	<i>didi</i>	69.9 ± 5.2	208 ± 13
	<i>di+</i>	13.8 ± 4.0*	1836 ± 246*
ISIAH	++	5.6 ± 2.1*	2221 ± 79*

*Difference from the Brattleboro rat strain significant at $p < 0.001$.



Tumor growth in rats after carcinoma Walker 256 grafting: *a*, hybrids *di+* and *didi*; *b*, parental strains Brattleboro and ISIAH.

*Difference significant at $p < 0.001$.

Table 2. Phenotypic expression of marker genes in parental strains Brattleboro and ISIAH and in hybrids obtained in test crosses

Rats	Locus genotype			Blood vasopressin	Tumor regression
	<i>diabetes</i>	<i>albino</i>	<i>hooded</i>		
Brattleboro	<i>didi</i>	CC	<i>hh</i>	absent	yes
(ISIAH × Brattleboro) F ₁ × Brattleboro	<i>didi</i>	Cc	<i>hh</i>	absent	yes
	<i>di+</i>	Cc	<i>hh</i>	present	no
ISIAH	++	cc	<i>hh</i>	present	no

вазопрессина рецессивен, у гетерозиготных гибридов *di+* также в достаточном количестве синтезируется вазопрессин, и, соответственно, у них никак не проявляются признаки несахарного диабета. Это делает их фенотипически не отличимыми от гомозигот (++) с нормальным геном вазопрессина (табл. 1).

Крысы линий Brattleboro и ISIAH имеют ряд других различий в составе аллелей некоторых маркерных локусов. Для оценки влияния генетического фона на проявление искомого признака мы провели дополнительный анализ расщепления по локусам *капюшон* (*hooded*, *h*) и *альбино* (*albino*, *C*). На генетической карте крысы маркеры лока-

лизированы в разных группах сцепления: *капюшон* – в 6-й, *альбино* – в 1-й, а *вазопрессин* (*diabetes*) – в 4-й (O'Brien, 1987; Kheday, Golubjatnikova, 1993). Распределение гибридных потомков по фенотипам маркерных генов приведено в табл. 2.

Очевидно, что регрессия опухоли наследуется конкордантно только с мутантным гомозиготным генотипом *didi*, а в случае наличия у особи хотя бы одного нормального гена вазопрессина имеет место непрерывный рост опухоли независимо от состава аллелей генов маркеров окраса шерсти. Данный признак также не проявляется и не расщепляется при скрещивании крыс ISIAH и нормотен-

живных крыс с гомозиготным генотипом по нормальному гену вазопрессина и, следовательно, не зависит от экспрессии большинства генов, обуславливающих наследственный характер стресс-индуцированной артериальной гипертензии. Генетическая детерминация нарушенного артериального давления у крыс ISIAH имеет другую более сложную структуру и затрагивает преимущественно калликреин-кининовую систему гемостаза почки (Редина и др., 2014; Redina et al., 2015).

Таким образом, анализ полученных результатов в совокупности позволяет сделать заключение, что особенности динамики опухоли, наблюдаемые у крыс линии Brattleboro, с высокой вероятностью связаны с отсутствием у них вазопрессина. Механизм регрессии карциносаркомы Walker 256 у особей мутантного генотипа *didi*, по-видимому, включает элементы иммунологического контроля гистосовместимости и регуляцию клеточной пролиферации. Предполагается продолжение работы в этом направлении.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004.

The author is grateful to the staff of the Vivarium of conventional animals, ICG SB RAS, Novosibirsk, for assistance in animal breeding.

Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

References

- Bender K., Adams M., Baverstock P.R., den Biemann M., Bissbort S., Brdicka R., Butcher G.W., Cramer D.V., von Deimling O., Festing M.F.W., Gunter E., Guttman R.D., Hedrich H.J., Kendall P.B., Kluge R., Moutier R., Simon B., Womack J.E., Yamada J., van Zutphen B. Biochemical markers in inbred strains of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenetics*. 1984;19:257-266.
- Khagai I.I. Specific expression of gene *di* (diabetes insipidus) in homologous inbred rat lines. *Rus. J. Genet.* 2002;38(12):1424-1427.
- Khagai I.I. Phenotypic expression of the mutant gene diabetes insipidus in rats and criteria of genotyping by phenotype. *Rus. J. Genet.* 2003;39(1):57-60.
- Khagai I.I., Golubjatnikova A.V. Localization in the fourth linkage group of a gene *di* affecting diabetes insipidus in rats. *Biochem. Genet.* 1993;31(3/4):201-204.
- Khagai I.I., Melnikova V.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. The effect of vasopressin on the Zajdela hepatocellular carcinoma growth rate. *Doklady Biol. Sci.* 2014;457(3):222-224.
- Khagai I.I., Melnikova V.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. The effect of vasopressin on Seidel's hepatocellular carcinoma growth rate. *Doklady Akademii Nauk=Proceedings of the Russian Academy of Sciences*. 2014;457(3):363-365.
- Khagai I.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. Walker 256 tumor growth in rats with hereditary defect of vasopressin synthesis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006;142(3):344-346.
- Khagai I.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. Walker 256 tumor growth in rats with a hereditary defect of vasopressin synthesis. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny=Bulletin of experimental biology and medicine*. 2006;142(9):316-318.
- Markel A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. In: *Genetic hypertension*. Volume 218. Sassard J., editor. London: Colloque INSERM; 1992:405-407.
- O'Brien S.J. *Genetic Maps*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1987;4:464-469.
- Redina O.E., Klimov L.O., Ershov N.I., Abramova T.O., Ivanova L.N., Markel A.L. The downregulation of genes controlling vascular tone in kidneys of ISIAH rats with stress-induced arterial hypertension. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(4/2):910-919.
- Redina O.E., Klimov L.O., Ershov N.I., Abramova T.O., Ivanova L.N., Markel A.L. The decreased expression of genes controlling the vascular tone in the kidneys of ISIAH rats with stress-induced arterial hypertension. *Rus. J. Genet.: Appl. Res.* 2015;5(4):340-347. DOI 10.1134/S2079059715040127
- Schmale H., Richter D. Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature*. 1984;308:705-709.
- Valtin H. The discovery of the Brattleboro rat, recommended nomenclature, and the question of proper controls. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982;394:1-9.
- Vrionis F.D., Wu J.K., Qi P., Cano W.G., Cherington V.J. Tumor cells expressing the herpes simplex virus-thymidine kinase gene in the treatment of Walker 256 meningeal neoplasia in rats. *J. Neurosurg.* 1996;84:250-257.



Особенности экспериментального планирования при исследовании транскриптомов методами высокопроизводительного секвенирования

П.Н. Меньшанов^{1, 2}✉, Н.Н. Дыгало^{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 обзоре проанализированы отдельные проблемы планирования экспериментов с использованием методов RNA-Seq и Ribo-Seq, а также консолидированы ранее опубликованные рекомендации консорциума ENCODE (2011) и других авторов по вопросам планирования экспериментов при изучении транскриптомов как у млекопитающих, так и у других животных и растений. Существует предел увеличения глубины секвенирования для идентификации практически всех активно транскрибируемых в образце генов, который зависит от размера транскриптома у объекта исследования. Увеличение глубины прочтения транскриптома выше рекомендуемой не даст значительного повышения статистической мощности исследования. У млекопитающих для идентификации активно транскрибируемых генов оптимальная глубина секвенирования составляет $\sim 2 \times 10^9$ п. н. на биологический образец. Для остальных видов глубина секвенирования на образец определяется с учетом данного значения, но должна быть пересчитана относительно протяженности транскриптома и удельного количества РНК на клетку в сравнении с транскриптомом млекопитающих. Выявление дифференциально экспрессируемых генов и стыков сайтов сплайсинга в мРНК можно улучшить, повышая число анализируемых биологических образцов в экспериментальных группах. Минимально допустимое число биологических повторов в группе должно быть равно двум. В то же время оптимальное число биологических повторов при соблюдении вышеозначенной глубины секвенирования составляет 5–8 образцов (как и при количественной оценке экспрессии отдельных генов методом qRT-PCR). При выполнении определения последовательности транскриптов рекомендуется использовать технологии секвенирования, точность определения буквы последовательности для которых $\geq 0,999$. Учитывая удельную себестоимость секвенирования, для метода RNA-Seq целесообразно использовать технологии, дающие риды длиной ≥ 75 п. н. Удельные затраты на секвенирование в контрольных группах можно снизить за счет увеличения числа опытных экспериментальных групп путем компоновки нескольких сходных экспериментов или логического усложнения исходного эксперимента. Данные рекомендации могут быть использованы для планирования экспериментов по изучению транскриптомов в функциональной геномике.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование; транскриптом; RNA-Seq; Ribo-Seq; планирование эксперимента.

The design of experiments for the transcriptome studies by high-throughput sequencing methods

P.N. Menshanov^{1, 2}✉, N.N. Dygalo^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The common questions in the design of the high-throughput sequencing experiments using RNA-Seq or Ribo-Seq methods are reviewed. The ENCODE guidelines (2011) as well as the recently published advances in the design of the studies of mammalian, animal and plant transcriptomes are also summarized in this review. The optimal limit of the sequencing depth does exist for the identification of almost all actively transcribed genes. This limit depends on the transcriptome size in the biological object studied. Additional sequencing does not provide any substantial additional information about the transcriptome complexity. For mammals, the optimal limit of the sequencing depth for the identification of the actively transcribed genes is equal to $\sim 2 \times 10^9$ bp per biological sample. For other species, the optimal limit of the sequencing depth per biological sample is determined similarly for mammals; however, the transcriptome size and the mean RNA content in the studied object should be taken into account, in comparison to the mammalian transcriptomes. The discovery of differentially expressed genes, as well as the identification of splicing sites in the mRNA could be enhanced by increasing the number of biological samples analyzed per each experimental group. The minimal number of biological replicates per experimental group is equal to 2. However, the optimal number of biological replicates per experimental group is equal to 5–8 (similar to the experiments quantifying the expression of single genes by qRT-PCR). For the transcriptome studies, it is recommended to use the sequencing technologies that have the accuracy of sequencing ≥ 0.999 per bp. For RNA-Seq, it is also recommended to use the technologies that are able to produce reads equal to or larger than 75 bp, to minimize the cost of the effective identification of the sequences. The relative cost for the sequencing of the control samples could be

REVIEW

Received 29.09.2015 r.

Accepted for publication 30.11.2015 r.

© AUTHORS, 2016



e-mail: MenshanovPN@icg.sbras.ru

reduced by increasing the number of experimental groups in the experiment or by combining several independent experiments with similar control groups. The present notes could be utilized during the design step in the experimental studies devoted to the research of transcriptomes.

Key words: high-throughput sequencing; transcriptome; RNA-Seq; Ribo-Seq; design of the experiment.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Меньшанов П.Н., Дыгало Н.Н. Особенности экспериментального планирования при исследовании транскриптомов методами высокопроизводительного секвенирования. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):247-254. DOI 10.18699/VJ16.148

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Menshanov P.N., Dygalo N.N. The design of experiments for the transcriptome studies by high-throughput sequencing methods. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):247-254. DOI 10.18699/VJ16.148

Две технологии высокопроизводительного секвенирования, используемые при изучении транскриптомов у животных и растений – метод RNA-Seq для определения последовательностей транскрибируемого генома и метод Ribo-Seq для определения последовательностей транслируемого генома – постепенно становятся базовыми инструментами современной функциональной генетики для исследования экспрессии генов в самых разнообразных моделях *in vivo* и *in vitro* (Wang et al., 2009; Sims et al., 2014; Ingolia, 2014). Использование данных методов уже позволило выявить существование значительного числа новых транскриптов с неизвестной функцией, считываемых в самых различных тканях организма (van Bakel et al., 2011; Aspden et al., 2014; Xie et al., 2014), обнаружить резкую «перестройку» транскриптома после стресса (Moskalev et al., 2015), подтвердить функциональный хаос регуляции транскрипции у гибридов (McManus et al., 2010). При изучении тканевых транскриптомов также были составлены подробные молекулярные атласы представленности различных функционально значимых транскриптов в тканях организма у человека, крысы, мыши и других модельных животных и растений (например, Hawrylycz et al., 2012; O'Rourke et al., 2014).

Главным лимитирующим фактором, ограничивающим возможности экспериментаторов при планировании и проведении исследований транскриптомов, является ограниченность финансовых, трудовых и временных ресурсов, затраченных на подобные эксперименты (Sims et al., 2014). Удельная стоимость секвенирования 1×10^6 п. н. генома до 2010 г. составляла более одного доллара на всех имеющихся платформах (Mardis, 2008; Wetterstrand, 2015) (рис. 1). В связи с подобной высокой стоимостью секвенирования до 2010 г. эксперименты по изучению дифференциально экспрессируемых генов методами RNA-Seq и RiboSeq были по большей части невозможны в силу своей дороговизны, а в период 2011–2015 гг. эксперименты по сравнительному анализу транскриптомов чаще всего представляли собой прямое сравнение двух экспериментальных групп размером в один–три биологических повтора каждая (Sims et al., 2013). Вместе с тем активное развитие технологий секвенирования второго поколения привело в последние пять лет к значительному снижению удельной стоимости исследования генетической информации (рис. 1) и позволило ученым

планировать эксперимент, принимая во внимание такие параметры, как глубина секвенирования, количество экспериментальных групп и образцов на группу.

В настоящее время существует значительное число обзоров литературы, детально рассказывающих о технических особенностях считывания ридов при секвенировании транскриптомов на различных платформах (например, Ansorge, 2009; Mutz et al., 2013), а также о программах и алгоритмах, которые могут быть использованы на второй стадии исследования – стадии сборки транскриптов (например, Martin, Wang, 2011; Florea, Salzberg, 2013; Ghosh, Chan, 2016). Вместе с тем в литературе мало внимания уделяется базовым правилам планирования экспериментов RNA-Seq и Ribo-Seq, а большинство информации, посвященной данному вопросу, встречается в разрозненном виде в обзорах литературы, описывающих технологию полногеномного секвенирования (например, Sim et al., 2014). Единственные правила проведения экспериментов (правила консорциума ENCODE – «Standards, Guidelines and Best Practices for RNA-Seq», редакция 1.0) были сформированы на основе данных, полученных при изучении транскриптомов у млекопитающих, и не обновлялись с 2011 г. (ENCODE 2011; Spies, Ciaudo, 2015). В этом обзоре проанализирован ряд важных вопросов планирования полногеномных экспериментов с использованием методов RNA-Seq и Ribo-Seq, а также консолидированы ранее опубликованные советы по планированию транскриптомных экспериментов, которые до настоящего времени были представлены в разрозненном виде в ключевых публикациях и обзорах (например, Corney, 2013; Hart et al., 2013a, b). Все эти рекомендации могут быть использованы для планирования экспериментов по изучению транскриптомов и у животных, и у растений в различных функциональных моделях *in vivo* и *in vitro*.

Глубина секвенирования транскриптома

Очевидно, что глубина секвенирования транскриптома определяется целью эксперимента, которая может сводиться как (1) к простому определению всех активно транскрибируемых экзонов, так и (2) к идентификации всех считываемых вариантов транскриптов, стыков сайтов сплайсинга и вариантов полиморфных сайтов в транскриптах образца (Veeneman et al., 2015). Отдельно следует

отметить, что правила консорциума ENCODE (2011) были сформулированы на основании данных, полученных при исследовании транскриптомов у ключевых модельных млекопитающих (мыши, крысы, люди) с размером генома $\sim 10^9$ п. н. По этой причине для остальных биологических видов необходимая глубина секвенирования на биологический образец также определяется с учетом этих правил, однако должна быть пересчитана относительно протяженности транскриптома (длины всех участков генома, кодирующих транскрипты) и удельного количества РНК на клетку в сравнении с транскриптомом млекопитающих.

Идентификация активно транскрибируемых мРНК у млекопитающих

Исходно в правилах ENCODE (2011) было зафиксировано (для млекопитающих), что для выявления активно транскрибируемых в образце мРНК достаточно определить последовательность у не менее чем 20–25 млн ридов, при этом длина рида должна быть ≥ 30 п. н. (эквивалентно $\geq 1,5 \times 10^9$ п. н. генетической информации). Этот тезис опирается на данные членов консорциума ENCODE (Mortazavi et al., 2008) и на более ранние оценки группы Galau (Galau et al., 1977), согласно которым в относительно гомогенной ткани у млекопитающих (например в печени) гены с активно работающими промоторами должны давать как минимум один транскрипт на клетку, и уровень таких мРНК должен быть не менее 0,3–1,0 FPKM. Как следствие, в большинстве экспериментов с применением RNA-Seq, опубликованных в начале 2010-х годов, глубина секвенирования на образец животного происхождения составляла порядка 1×10^9 – 3×10^9 п. н. (Sims et al., 2013).

Однако достаточно ли такой глубины прочтения транскриптома в современных экспериментах? Правило по глубине секвенирования от ENCODE неоднократно подвергалось критике другими членами сообщества (например, Hebenstreit et al., 2011). Более того, было установлено, что число идентифицируемых в образце транскриптов зависит от глубины секвенирования (Tarazona et al., 2011).

Последующие исследования подтвердили тезис ENCODE по глубине секвенирования для выявления уникальных транскриптов. В частности, Hart с коллегами (2013b) на основании данных 127 экспериментов RNA-Seq установили, что в подавляющем большинстве случаев свыше 90 % транскриптов определяются на уровне $> 0,1$ FPKM даже в образцах из неоднородных тканей. Marinov с коллегами (2014) также установили, что для подавляющего большинства активных белок-кодирующих генов в одной клетке млекопитающих в каждый конкретный момент времени присутствует лишь от 50 000 до 1 транскрипта на клетку. В результате члены консорциума ENCODE подтвердили, что активные гены обычно имеют уровень экспрессии не ниже 0,5–5 FPKM (чем больше значение, тем меньше тотальной РНК было в исследуемой клетке), что в грубом приближении эквивалентно одному транскрипту на клетку (Kellis et al., 2014).

Еще одним доказательством данного правила ENCODE стало исследование Hart с коллегами (2013a), в котором была предложена модель, классифицирующая все гены на: (а) гены с неактивированными промоторами в гетерохроматине и (б) гены с активными промоторами,

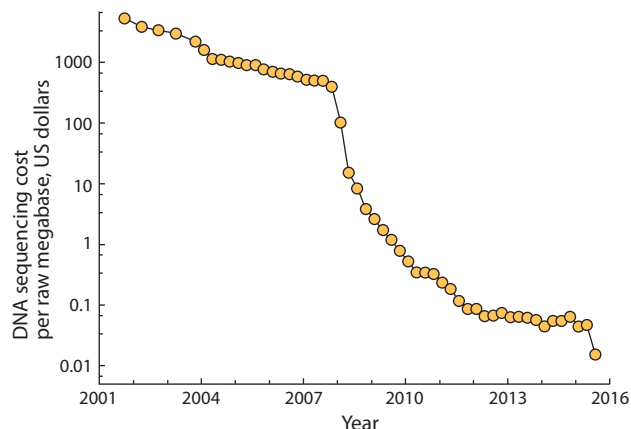


Fig. 1. The cost of DNA sequencing in US dollars per raw megabase in 2001–2015 (according to the NHGRI Genome Sequencing Program).

локализованные в эухроматине (Hart et al., 2013a). В этой работе было показано, что для простой идентификации подавляющего большинства генов с активным промотором у млекопитающих вполне достаточно 20–30 млн ридов ($\geq 2 \times 10^9$ п. н. на образец), и дальнейшее увеличение глубины секвенирования не дает практически никакой дополнительной информации об отдельных транскриптах (Hart et al., 2013a).

Все эти исследования свидетельствуют о том, что не требуется бесконечное увеличение глубины секвенирования для идентификации практически всех активно транскрибируемых в образце экзонов – достаточно определить последовательность у более чем 20–30 млн ридов с длиной не менее чем 50 п. н. (порядка 2×10^9 п. н. генетической информации). Даже если транскрипт будет представлен не во всех клетках (лишь в ~ 20 –50 % от общего числа клеток), имеющихся данных будет вполне достаточно для идентификации большинства таких мРНК у млекопитающих (Hart et al., 2013b).

Идентификация альтернативно транскрибируемых мРНК у млекопитающих

Для целей идентификации стыков сайтов сплайсинга, получившихся в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК, а также вариантов полиморфных сайтов в транскриптах подобной глубины прочтения в одном образце будет заведомо недостаточно. По мнению консорциума ENCODE (2011), уверенная детекция большинства стыков сайтов сплайсинга и полиморфных вариантов возможна лишь при прочтении не менее 100–200 млн парных ридов длиной не менее 75 п. н. (15×10^9 – 30×10^9 п. н. информации). Наши данные также указывают на то, что использование ридов с длинами 75 п. н. и более для детекции стыков сайтов сплайсинга является наиболее оптимальным с экономической точки зрения, если медианная длина экзона у транскриптов равна или больше таковой у млекопитающих (Menshanov, Dygalo, 2015).

Вместе с тем следует обратить внимание на существование зависимости между длиной рида (пары ридов)

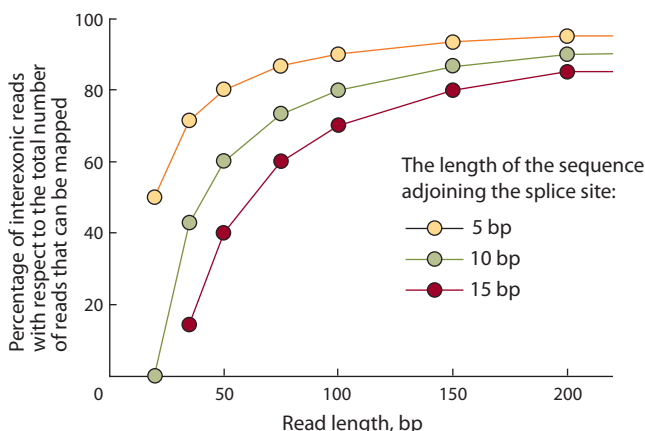


Fig. 2. The maximal portion of interexonic reads in the total number of reads of a specified size (X axis: base pairs) that can be mapped with a preset length of anchors on each side of the junction used to detect a splice site (calculated for mammals, the median exon size being 140 bp).

и долей ридов, несущих стыки сайтов сплайсинга (рис. 2). В частности, это важно для метода Ribo-Seq, для которого эффективная длина рида составляет всего лишь ~30 п. н., именно такой участок транскрибуемой мРНК защищен рибосомой от деградации (Ingolia, 2014). В результате даже при использовании современных алгоритмов для сборки транскриптов не более чем 30–40 % ридов будут содержать необходимую для экспериментатора и однозначно восстанавливаемую информацию о местах стыка сайтов сплайсинга. По этой причине при использовании метода Ribo-Seq надежная детекция стыков сайтов сплайсинга для транскриптома млекопитающих будет достигнута лишь при считывании не менее чем 500 млн ридов.

Для метода RNA-Seq расчетные данные свидетельствуют о нецелесообразности использования сверхдлинных ридов (более 150–200 п. н.) и достижении высокой эффективности детекции стыков сайтов сплайсинга уже при использовании парных ридов длиной 100 п. н. (рис. 2) (Menshanov, Dygalo, 2015). Сверхдлинные риды целесообразно использовать лишь для специфических задач, определенных целями эксперимента.

Глубина секвенирования транскриптома, протяженность транскриптома и удельное количество РНК в клетках

Необходимо помнить, что все вышеперечисленные рекомендации, в том числе и рекомендации ENCODE, опираются на данные, полученные в экспериментах RNA-Seq у млекопитающих, протяженность транскриптома у которых не превышает 100 млн п. н. Однако следует отметить, что протяженность транскриптома слабо коррелирует с размером генома у различных животных и растений, что затрудняет предсказание данного показателя для транскриптома у видов, для которых известен лишь размер генома (Corney, 2013; Kagale et al., 2014; Coate, Doyle, 2015). По этим причинам планирование глубины секвенирования транскриптома в каждом конкретном эксперименте должно учитывать не только расчетную,

но и по возможности ранее определенную протяженность транскриптома у исследуемого вида. Например, протяженность транскриптома дрозофилы ненамного меньше транскриптома у млекопитающих (Nfonsam et al., 2012). В то же время у злаковых средняя протяженность транскриптома в два–три раза больше, чем у мыши (Krasileva et al., 2013), поэтому для этих видов растений целесообразно установить глубину секвенирования не менее чем в $4\text{--}5 \times 10^9$ п. н.

Активно используемое в западной литературе понятие «размер транскриптома» (transcriptome size) может быть определено и как количество транскриптов и РНК в клетке (Coate, Doyle, 2010, 2015), которое также лишь частично коррелирует с размером генома (Marguerat, Bähler, 2012). Удельное количество РНК и транскриптов в клетке может варьировать не только у различных видов эукариот и прокариот, но и у разнополых особей отдельных видов, у одного организма в различных тканях, в одной и той же ткани на разных этапах развития и даже в одной и той же ткани до и после отдельных экспериментальных воздействий (Coate, Doyle, 2010, 2015). Например, удельное количество РНК в листьях мангровых деревьев в четыре раза выше, чем в камбиальной ткани ствола (Reef et al., 2010). Удельное содержание РНК в гепатоцитах более чем в 20 раз превышает аналогичный показатель в тимоцитах (Schmidt, Schibler, 1995). Также следует отметить, что воздействие глюкокортикоидами приводит к увеличению удельного количества РНК в печени крыс (Thompson et al., 1976; Flusser et al., 1989). В то же время в мозге, тимусе, а также ряде других тканей у млекопитающих под влиянием глюкокортикоидов происходит не увеличение, а уменьшение удельного количества РНК (Zimmerman et al., 1970). Соответственно, при планировании глубины секвенирования необходимо учитывать не только протяженность транскриптома, но и удельное количество РНК к ДНК и целевых РНК в исследуемых клетках.

Число экспериментальных групп

В связи с высокой себестоимостью полногеномного анализа одним из важнейших вопросов планирования экспериментов RNA-Seq и Ribo-Seq является определение минимального и оптимального числа экспериментальных групп для разных категорий экспериментов (сравнение экспрессии в различных тканях, временная динамика транскриптома после воздействия, диуринальная и возрастная динамика транскриптома). Поскольку существует бесконечное множество различных дизайнов экспериментов, правила ENCODE (2011) никак не регламентируют число экспериментальных групп, оставляя данный параметр на усмотрение экспериментатора.

Pembroke с коллегами (2015) установил, что в ходе диуринального цикла значительное число транскриптов имеет не простую синусоидальную динамику изменений, как считалось ранее, а более сложную – с двумя пиками. Индукция (или снижение) уровня ряда транскриптов после воздействия экспериментального фактора также может быть неодновременной, что проявляется в появлении нескольких «волн» изменений у так называемых «ранних» и «поздних» дифференциально экспрессируемых генов (например, Arner et al., 2015). Подобные неодновремен-

ные изменения экспрессии регуляторных генов (например транскрипционных факторов) могут приводить к появлению и более сложных паттернов экспрессии отдельных мРНК после воздействия (например, Shishkina et al., 2015).

Учитывая все вышесказанное, (1) для экспериментов, предполагающих лишь банальное сравнение базального уровня транскриптов в нескольких тканях (в одной ткани у разных видов и т.д.), целесообразно планировать по одной экспериментальной группе на каждый объект исследования; (2) для исследований, предполагающих изучение динамики уровня транскриптов в онтогенезе, также следует готовить по одной экспериментальной группе на каждый планируемый к изучению возраст (например, Kozhevnikova et al., 2013); (3) для экспериментов, предполагающих изучение диуринальных ритмов изменения транскрипции, минимально должны быть изучены две временные точки. Однако в свете данных Rembrock с коллегами (2015), более корректным будет исследование уровня транскриптов в не менее чем четырех временных точках (днем, ночью, утром и вечером, как у Hughes с коллегами (2012), а в идеале – через каждые 3–4 ч; (4) для исследований, предполагающих изучение динамики транскриптома после воздействия экспериментального фактора, минимально допустимым является определение либо «ранних» (через 30–120 мин после воздействия), либо совокупности «ранних» и «поздних» дифференциально экспрессируемых генов (через 2–12 ч после воздействия). Вместе с тем в таких случаях более разумным представляется определение динамики изменений как минимум в двух опытных точках – для установления и «ранних», и «поздних» генов, а также генов с уникальным паттерном экспрессии (помимо определения базального уровня транскриптов).

Следует отметить, что многие важные гены за счет существующих сетей регуляции транскрипции имеют сложный, неволноподобный паттерн экспрессии, который не укладывается в простую модель ранней и поздней «волны» изменений (Arner et al., 2015). Одним из наиболее характерных примеров таких генов является ген *bcl-X*, уровень длинного транскрипта которого может быть индуцирован глюкокортикоидами в стволе мозга через 6 ч после начала воздействия, однако уже через 2 ч после этого уровень мРНК Bcl-XL восстанавливается до базального (Shishkina et al., 2015). Очевидно, что для идентификации таких генов потребуется более чем две экспериментальные точки для оценки уровня целевых транскриптов после исходного воздействия.

Число внутригрупповых повторов

Ранее было установлено, что при достаточной глубине прочтения каждого биологического образца ($\geq 2 \times 10^9$ п. н. на образец) самым разумным методом повышения мощности исследования является увеличение числа биологических повторов, а не глубины секвенирования каждого образца (Ching et al., 2014; Liu et al., 2014). Однако сколько биологических повторов необходимо и достаточно делать при исследовании транскриптома?

Правила ENCODE (2011) устанавливают, что минимальное число биологических повторов в группе должно быть не менее двух. Подобный дизайн позволяет проверить

внутригрупповую дисперсию и определить условное «качество» детекции целевых транскриптов – коэффициент детерминации R^2 . В соответствии с правилами ENCODE, данный параметр должен быть не менее 0,90. В противном случае исследователь должен объяснить причину возникновения низкого значения коэффициента детерминации, либо воспроизвести результаты эксперимента.

Для выявления целевых дифференциально экспрессируемых генов (как и при количественной оценке экспрессии отдельных генов методом qRT-PCR) целесообразно оценивать необходимое число образцов в каждой группе, используя классический анализ статистической мощности и учитывая ожидаемую вариабельность уровня исследуемых транскриптов (Karlen et al., 2007; Spies, Ciaudo, 2015). Для идентификации практически всех мРНК, уровень которых изменился в $\geq 1,5$ раза и средняя копияность которых выше, чем один транскрипт на клетку, оптимальным размером группы будет пять–восемь образцов на экспериментальную группу (Karlen et al., 2007).

Выбор платформы для высокопроизводительного секвенирования

Каждая платформа для выполнения полногеномных исследований имеет ряд технических характеристик, которые определяют качество секвенирования. При планировании эксперимента следует обращать внимание на такие параметры, как длина и парность рида, которые дает платформа, а также на вероятность совершения ошибки при определении одного нуклеотида.

В табл. 1 приведены данные по доле ридов определенной длины с различным количеством технических ошибок, в зависимости от используемой платформы (Corneu, 2013; Fox et al., 2014). Поскольку для метода Ribo-Seq эффективная длина рида составляет всего лишь ~ 30 п. н. (Ingolia, 2014), то для экспериментов с использованием данного метода платформами выбора будут платформы SOLiD и Illumina с короткими непарными ридами длиной не более 50 п. н., дающие значительное число ридов без ошибок (табл. 1).

Табл. 2 содержит информацию об удельной цене секвенирования 1×10^9 п. н. на различных платформах для метода RNA-Seq. Учитывая данные Menshanov и Dygalo (2015), для RNA-Seq целесообразным будет использование платформы Illumina 4000 в варианте с парными ридами длиной ≥ 100 п. н., для которой стоимость эффективного секвенирования 1×10^9 п. н. будет ниже 50 долл. США (рис. 2, табл. 2).

Удельная цена секвенирования

Отдельно стоит оговорить возможности по экономии денежных ресурсов при выполнении экспериментов RNA-Seq и Ribo-Seq. Существует ряд возможностей оптимизации затрат на проведение полногеномных исследований путем корректного планирования проведения эксперимента. Например, очевидно, что число контрольных и опытных групп определяется целями эксперимента (см. выше). Удельную стоимость выполнения эксперимента можно снизить путем увеличения числа опытных (неконтрольных) экспериментальных групп, что обычно достигается за счет компоновки в одном исследовании

Table 1. Percentages of reads with specified numbers of basic sequencing errors with different sequencing platforms

Platform	Probability of an improper determination of a single nucleotide	Percentages of 30-bp reads with certain numbers of sequence errors (Ribo-Seq)			Percentages of 100bp reads with certain numbers of sequence errors (RNA-Seq)		
		no errors	1 error	≥ 2 errors	no errors	1 error	≥ 2 errors
454 GS Junior PacBio RS Ion Torrent/Proton	~ 0.01	73.97 %	22.42 %	≤ 3.62 %	36.60 %	36.97 %	26.42 %
Solid	~ 0.001	97.04 %	2.91 %	≤ 0.05 %	–	–	–
Illumina	~ 0.001	97.04 %	2.91 %	≤ 0.05 %	90.48 %	9.06 %	≤ 0.47 %

Table 2. The cost of DNA sequencing in US dollars per raw gigabase (RNA-seq method) depends on the length of a single read and on the type of the sequencing platform

Sequencing platform	Single read length, bp	Cost of sequencing per raw gigabase, US dollars	Cost of obtaining equivalent numbers of interexonic reads, US dollars
SOLID	50	70	~ 120
SOLID	75	55.6	~ 65
Illumina 2000	50	110	~ 190
Illumina 2000	75	90	~ 105
Illumina 2000	100	75	~ 75
Illumina 4000	100	45	~ 45

According to Menshanov, Dygalo (2015), with additions.

Table 3. The proportion of the cost of data analysis in control experimental groups in the total cost of the sequence determination in all experimental groups (with the assumption of equal numbers of raw sequencing information obtained in each experimental group)

Number of control groups	Total number of experimental groups								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	50	33.3	25	20	16.7	14.3	12.5	11.1	10
2	–	66.7	50	40	33.3	28.6	25	22.2	20
3	–	–	75	60	50	42.9	37.5	33.3	30

нескольких сходных экспериментов или усложнения исходного эксперимента. В результате, если экспериментатор будет в одном исследовании сопоставлять несколько воздействий, то удельные затраты на секвенирование контрольных групп будут снижаться (табл. 3).
Еще одной важной проблемой является неразвитость центров коллективного пользования на территории Российской Федерации и, по сути, региональная монополизация данной высокотехнологичной отрасли несколькими игроками, обладающими доступом к приборной базе. На мировом рынке секвенирования существует значительное число крупных и мелких игроков, предоставляющих свои услуги по полногеномному секвенированию за вполне приемлемую цену. Из крупных игроков наибольшего внимания заслуживают BGI Technologies (www.bgitech.com) и Macrogen (www.macrogenlab.com), которые занимают более 50 % всего рынка коммерческого секвенирования. В связи с этим сопоставление цен секвенирования в различных отечественных и зарубежных центрах, где может

проводиться коммерческое определение последовательности транскриптомов методами RNA-Seq и Ribo-Seq, а также вмененных затрат на транспортировку образцов до таких центров, становится важным элементом планирования эксперимента.

Выбор между методами RNA-Seq и qRT-PCR

Группа Nonis с коллегами (2014) провела сравнительный анализ себестоимости количественной оценки уровней у различного числа транскриптов в предопределенном числе образцов при использовании высокопроизводительного секвенирования методом RNA-Seq и классического метода qRT-PCR. Было показано, что использование современных платформ высокопроизводительного секвенирования, дающих риды длиной не менее 75–100 п. н., для оценки уровней у более чем 200–250 транскриптов методом RNA-Seq всегда экономически выгоднее аналогичного исследования, выполненного методом qRT-PCR, если брать цены 2014–2015 гг. (подробнее Nonis et al.,

2014) (рис. 3). Так как в биологических объектах присутствуют не сотни, а тысячи различных транскриптов, исследование Nonis с коллегами (2014) подтвердило экономическое преимущество применения метода RNA-Seq над qRT-PCR для количественной оценки уровней транскриптов. Использование метода RNA-Seq позволяет исследовать не только уровни транскриптов, но и их последовательности. Как следствие, преимущество применения высокопроизводительного секвенирования в функциональной геномике является неоспоримым.

Представленные в настоящем обзоре рекомендации не являются исчерпывающими. Отдельно следует отметить, что для нужд клинической генетики (детекция соматических и генеративных полиморфных вариантов генома) уже разработан либо продолжает разрабатываться целый набор правил (Bennett, Farah, 2014; Gargis et al., 2015), который также может быть использован и в экспериментальных целях. Дальнейшее развитие и удешевление полногеномного секвенирования позволят повысить эффективность исследований в области функциональной геномике методами RNA-Seq и Ribo-Seq. По этой причине планирование эксперимента будет неотъемлемой компонентой, позволяющей избежать потерь ресурсов в ходе выполнения научно-исследовательской деятельности в условиях бюджетных и иных ограничений.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004, and the Russian Foundation for Basic Research, projects 14-04-00219, 15-34-20574_mol_a_ved, and 13-04-40014-N KOMFI.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Ansorge W.J. Next-generation DNA sequencing techniques. *Nat. Biotechnol.* 2009;25(4):195-203. DOI 10.1016/j.nbt.2008.12.009
- Arner E., Beckhouse A., Briggs J., Ovchinnikov D., Wolvetang E., Wells C. and FANTOM Consortium. Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science*. 2015;347(6225):1010-1014. DOI 10.1126/science.1259418
- Aspden J.L., Eyre-Walker Y.C., Phillips R.J., Amin U., Mumtaz M.A., Brocard M., Couso J.P. Extensive translation of small open reading frames revealed by Poly-Ribo-Seq. *Elife*. 2014;3:e03528. DOI 10.7554/eLife.03528
- Bennett N.C., Farah C.S. Next-generation sequencing in clinical oncology: Next Steps Towards Clinical Validation. *Cancers (Basel)*. 2014;6(4):2296-2312. DOI 10.3390/cancers6042296
- Ching T., Huang S., Garmire L.X. Power analysis and sample size estimation for RNA-Seq differential expression. *RNA*. 2014;20(11):1684-1696. DOI 10.1261/rna.046011.114
- Coate J.E., Doyle J.J. Quantifying whole transcriptome size, a prerequisite for understanding transcriptome evolution across species: an example from a plant allopolyploid. *Genome Biol. Evol.* 2010;2:534-546. DOI 10.1093/gbe/evq038
- Coate J.E., Doyle J.J. Variation in transcriptome size: are we getting the message? *Chromosoma*. 2015;124(1):27-43. DOI 10.1007/s00412-014-0496-3
- Corney D.C. RNA-seq using next generation sequencing. *Mater. Methods*. 2013;3:203. DOI 10.13070/mm.en.3.203
- Florea L.D., Salzberg S.L. Genome-guided transcriptome assembly in the age of next-generation sequencing. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 2013;10(5):1234-1240.
- Flusser G., Ginzburg V., Meyuhos O. Glucocorticoids induce transcription of ribosomal protein genes in rat liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1989;64(2):213-222. DOI 10.1016/0303-7207(89)90148-2
- Fox E.J., Reid-Bayliss K.S., Emond M.J., Loeb L.A. Accuracy of next generation sequencing platforms. *Next Gener. Seq. Appl.* 2014;1:1000106. DOI 10.4172/jngsa.1000106
- Galau G.A., Klein W.H., Britten R.J., Davidson E.H. Significance of rare mRNA sequences in liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 1977;179(2):584-599. DOI 10.1016/0003-9861(77)90147-3
- Gargis A.S., Kalman L., Bick D.P., da Silva C., Dimmock D.P., Funke B.H., Gowrisankar S., Hegde M.R., Kulkarni S., Mason C.E., Nagarajan R., Voelkerding K.V., Worthey E.A., Aziz N., Barnes J., Bennett S.F., Bisht H., Church D.M., Dimitrova Z., Gargis S.R., Hafez N., Hambuch T., Hyland F.C., Luna R.A., MacCannell D., Mann T., McCluskey M.R., McDaniell T.K., Ganova-Raeva L.M., Rehm H.L., Reid J., Campo D.S., Resnick R.B., Ridge P.G., Salit M.L., Skums P., Wong L.J., Zehnbauser B.A., Zook J.M., Lubin I.M. Good laboratory

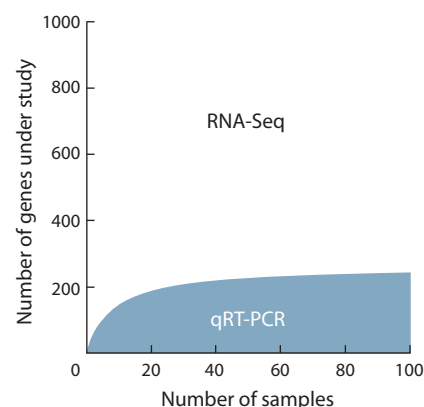


Fig. 3. The economic choice between RNA-Seq and qRT-PCR in the study of expression levels in a specified number of genes in a specific number of experimental samples (according to Nonis et al., 2014).

The reduction of the RNA-Seq cost shifts the border of equal economic efficiency of RNA-Seq/qRT-PCR use downward to the X-axis. The reduction of the qRT-PCR cost will shift this border upward from the X-axis.

practice for clinical next-generation sequencing informatics pipelines. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(7):689-693. DOI 10.1038/nbt.3237

- Ghosh S., Chan C.K. Analysis of RNA-Seq Data using TopHat and Cufflinks. *Method. Mol. Biol.* 2016;1374:339-361. DOI 10.1007/978-1-4939-3167-5_18
- Hart T., Komori H.K., LaMere S., Podshivalova K., Salomon D.R. Finding the active genes in deep RNA-seq gene expression studies. *BMC Genomics*. 2013;14:778. DOI 10.1186/1471-2164-14-778
- Hart S.N., Therneau T.M., Zhang Y., Poland G.A., Kocher J.P. Calculating sample size estimates for RNA sequencing data. *J. Comput. Biol.* 2013;20(12):970-978. DOI 10.1089/cmb.2012.0283
- Hawrylycz M.J., Lein E.S., Guillozet-Bongaerts A.L., Shen E.H., Ng L., Miller J.A., van de Lagemaat L.N., Smith K.A., Eberhart A., Riley Z.L., Abajian C., Beckmann C.F., Bernard A., Bertagnolli D., Boe A.F., Cartagena P.M., Chakravarty M.M., Chapin M., Chong J., Dalley R.A., Daly B.D., Dang C., Datta S., Dee N., Dolbeare T.A., Faber V., Feng D., Fowler D.R., Goldy J., Gregor B.W., Haradon Z., Haynor D.R., Hohmann J.G., Horvath S., Howard R.E., Jeromin A., Jochim J.M., Kinnunen M., Lau C., Lazars E.T., Lee C., Lemon T.A., Li L., Li Y., Morris J.A., Overly C.C., Parker P.D., Parry S.E., Reding M., Royall J.J., Schalkin J., Sequeira P.A., Slaughterbeck C.R., Smith S.C., Sodt A.J., Sunkin S.M., Swanson B.E., Vawter M.P., Williams D., Wohnoutka P., Zielke H.R., Geschwind D.H., Hof P.R., Smith S.M., Koch C., Grant S.G., Jones A.R. An anato-

- mically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*. 2012;489(7416):391-399. DOI 10.1038/nature11405
- Hebenstreit D., Fang M., Gu M., Charoensawan V., van Oudenaarden A., Teichmann S.A. RNA sequencing reveals two major classes of gene expression levels in metazoan cells. *Mol. Syst. Biol.* 2011;7: 497. DOI 10.1038/msb.2011.28
- Hughes M.E., Grant G.R., Paquin C., Qian J., Nitabach M.N. Deep sequencing the circadian and diurnal transcriptome of *Drosophila* brain. *Genome Res.* 2012;22(7):1266-1281. DOI 10.1101/gr.128876.111
- Ingolia N.T. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15(3):205-213. DOI 10.1038/nrg3645
- Kagale S., Koh C., Nixon J., Bollina V., Clarke W.E., Tuteja R., Spillane C., Robinson S.J., Links M.G., Clarke C., Higgins E.E., Huebert T., Sharpe A.G., Parkin I.A. The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. *Nat. Commun.* 2014;5:3706. DOI 10.1038/ncomms4706
- Karlen Y., McNair A., Perseguers S., Mazza C., Mermod N. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:131. DOI 10.1186/1471-2105-8-131
- Kellis M., Wold B., Snyder M.P., Bernstein B.E., Kundaje A., Marinov G.K., Ward L.D., Birney E., Crawford G.E., Dekker J., Dunham I., Elnitski L.L., Farnham P.J., Feingold E.A., Gerstein M., Giddings M.C., Gilbert D.M., Gingeras T.R., Green E.D., Guigo R., Hubbard T., Kent J., Lieb J.D., Myers R.M., Pazin M.J., Ren B., Stamatoyannopoulos J.A., Weng Z., White K.P., Hardison R.C. Defining functional DNA elements in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(17):6131-6138. DOI 10.1073/pnas.1318948111
- Kozhevnikova O.S., Korbolina 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
- Krasileva K.V., Buffalo V., Bailey P., Pearce S., Ayling S., Tabbita F., Soria M., Wang S., IWGS Consortium, Akhunov E., Uauy C., Dubcovsky J. Separating homeologs by phasing in the tetraploid wheat transcriptome. *Genome Biol.* 2013;14(6):R66. DOI 10.1186/gb-2013-14-6-r66
- Liu Y., Zhou J., White K.P. RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication? *Bioinformatics.* 2014;30(3): 301-304. DOI 10.1093/bioinformatics/btt688
- Mardis E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 2008;24(3):133-141. DOI 10.1016/j.tig.2007.12.007
- Marguerat S., Bähler J. Coordinating genome expression with cell size. *Trends Genet.* 2012;28(11):560-565. DOI 10.1016/j.tig.2012.07.003
- Marinov G.K., Williams B.A., McCue K., Schroth G.P., Gertz J., Myers R.M., Wold B.J. From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res.* 2014;24(3):496-510. DOI 10.1101/gr.161034.113
- Martin J.A., Wang Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nat. Rev. Genet.* 2011;12(10):671-682. DOI 10.1038/nrg3068
- McManus C.J., Coolon J.D., Duff M.O., Eipper-Mains J., Graveley B.R., Wittkopp P.J. Regulatory divergence in *Drosophila* revealed by mRNA-seq. *Genome Res.* 2010;20(6):816-825. DOI 10.1101/gr.102491.109
- Menshanov P.N., Dygalo N.N. Methodological aspects of read mapping and assembly of transcriptomes derived from the brain tissue samples of *Rattus norvegicus*. *Rus. J. Genet. Appl. Res.* 2015;5(4):401-406. DOI 10.1134/S2079059715040097
- Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods.* 2008;5(7):621-628. DOI 10.1038/nmeth.1226
- Moskalev A., Zhikrivetskaya S., Krasnov G., Shaposhnikov M., Proshkina E., Borisoglebsky D., Danilov A., Peregudova D., Sharapova I., Dobrovolskaya E., Solovlev I., Zemskaya N., Shilova L., Snezhkina A., Kudryavtseva A. A comparison of the transcriptome of *Drosophila melanogaster* in response to entomopathogenic fungus, ionizing radiation, starvation and cold shock. *BMC Genomics.* 2015;16(Suppl. 13):S8. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S8
- Mutz K.O., Heikenbrinker A., Lönne M., Walter J.G., Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013;24(1):22-30. DOI 10.1016/j.copbio.2012.09.004
- Nfonsam L.E., Cano C., Mudge J., Schilkey F.D., Curtiss J. Analysis of the transcriptomes downstream of Eyeless and the Hedgehog, Decapentaplegic and Notch signaling pathways in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 2012;7(8):e44583. DOI 10.1371/journal.pone.0044583
- Nonis A., De Nardi B., Nonis A. Choosing between RT-qPCR and RNA-seq: a back-of-the-envelope estimate towards the definition of the break-even-point. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014;406(15):3533-3536. DOI 10.1007/s00216-014-7687-x
- O'Rourke J.A., Iniguez L.P., Fu F., Bucciarelli B., Miller S.S., Jackson S.A., McClean P.E., Li J., Dai X., Zhao P.X., Hernandez G., Vance C.P. An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics.* 2014;15:866. DOI 10.1186/1471-2164-15-866
- Pembroke W.G., Babbs A., Davies K., Ponting C.P., Oliver P.L. Temporal transcriptomics suggest that twin-peaking genes reset the clock. *Elife.* 2015;4 pii:e10518. DOI 10.7554/eLife.10518
- Reef R., Ball M.C., Feller I.C., Lovelock C.E. Relationships among RNA:DNA ratio, growth and elemental stoichiometry in mangrove trees. *Funct. Ecol.* 2010;24(5):1064-1072. DOI 10.1111/j.1365-2435.2010.01722.x
- Schmidt E.E., Schibler U. Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP. *J. Cell Biol.* 1995;128(4):467-483.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Lanshakov D.A., Babluk E.V., Dygalo N.N. Anti-apoptotic protein Bcl-xL expression in the midbrain raphe region is sensitive to stress and glucocorticoids. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143978. DOI 10.1371/journal.pone.0143978
- Sims D., Sudbery I., Illott N.E., Heger A., Ponting C.P. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15(2):121-132. DOI 10.1038/nrg3642
- Spies D., Ciaudo C. Dynamics in transcriptomics: advancements in RNA-seq time course and downstream analysis. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2015;13:469-477. DOI 10.1016/j.csbj.2015.08.004
- Tarazona S., García-Alcalde F., Dopazo J., Ferrer A., Conesa A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* 2011;21(12):2213-2223. DOI 10.1101/gr.124321.111
- The ENCODE Consortium. Standards, Guidelines and Best Practices for RNA-Seq V1.0. 1.0. 6-1-2011.
- Thompson W.L., Abeles F.B., Beall F.A., Dinterman R.E., Wannemacher R.W. Jr. Influence of the adrenal glucocorticoids on the stimulation of synthesis of hepatic ribonucleic acid and plasma acute-phase globulins by leucocytic endogenous mediator. *Biochem. J.* 1976; 156(1):25-32.
- van Bakel H., Nislow C., Blencowe B.J., Hughes T.R. Response to "The reality of pervasive transcription". *PLoS Biol.* 2011;9(7):e1001102. DOI 10.1371/journal.pbio.1001102
- Veeneman B.A., Shukla S., Dhanasekaran S.M., Chinnaiyan A.M., Nesvizhskii A.I. Two-pass alignment improves novel splice junction quantification. *Bioinformatics.* 2015;32:43-49. DOI 10.1093/bioinformatics/btv642
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10(1):57-63. DOI 10.1038/nrg2484
- Wetterstrand K. DNA sequencing costs: data from the NHGRI large-scale genome sequencing program. (2015). Available at <http://www.genome.gov/sequencingcosts/>
- Xie C., Yuan J., Li H., Li M., Zhao G., Bu D., Zhu W., Wu W., Chen R., Zhao Y. NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D98-D103. DOI 10.1093/nar/gkt1222
- Zimmerman E.F., Andrew F., Kalter H. Glucocorticoid inhibition of RNA synthesis responsible for cleft palate in mice: a model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970;67(2):779-785.



Введение оптогенетических векторов в мозг неонатальным животным для исследования функции нейронов в последующие периоды онтогенеза

Д.А. Ланшаков¹✉, У.С. Дрозд², Т.А. Запара³, Н.Н. Дыгало^{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

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Управление активностью клетки светом определенной длины волны с помощью светочувствительных ионных каналов, опсинов (оптогенетика) все более широко используется для исследования работы и функции нейронов. Внедрение в клеточную мембрану опсинов с последующим приобретением клеткой чувствительности к свету достигается с помощью вирусных векторов, созданных чаще всего на основе лентивирусов или аденоассоциированных вирусов (AAV) и несущих нуклеотидные последовательности, кодирующие белки фотоканалов. Введение в трансген-экспрессирующую кассету специфического для интересующего типа клеток промотора позволяет целенаправленно продуцировать опсин только в клетках-мишенях. Целью данной работы явились краткое описание оптогенетического подхода, а также анализ возможности его использования при введении вирусных векторов в мозг неонатальных животных для исследования функции нейронов *in vivo* в последующие периоды онтогенеза. В данной работе трехдневным крысам под холодным наркозом вводили в головной мозг оптовектор (pAAV-CAMKIIa-ChR2_{h134}-YFP), кодирующий фотоканал, активирующий нейрон, и маркерный желтый флуоресцентный белок под контролем CAMKIIa промотора, специфичного для глутаматергических нейронов. Пик экспрессии внесенного гена, как правило, приходится на 3–5-ю неделю после введения вектора, что наблюдалось и в нашем случае. Фотостимуляция нейронов гиппокампа 20-дневных животных, которым на третий день жизни вводили оптовектор, повышала разрядную активность этих нейронов, а также увеличивала в них экспрессию белка c-Fos, являющегося общепризнанным маркером нейрональной активации. В результате проведения такого исследования в более поздние сроки, через 60 дней после неонатального введения гена оптоканала, не было обнаружено ни его заметной экспрессии, ни фотоактивации нейронов-мишеней гиппокампа. Таким образом, неонатальное введение вирусного вектора, несущего ген оптоканала, эффективно при исследовании функции нейронов мозга в ювенильном возрасте крыс и требует дополнительной проверки экспрессии гена в последующие периоды онтогенеза.

Ключевые слова: оптогенетика; фоточувствительные белки; активность нейронов; аденоассоциированные вирусы; онтогенез; экспрессия.

Transfer of optogenetic vectors into the brain of neonatal animals to study neuron functions during subsequent periods of development

D.A. Lanshakov¹✉, U.S. Drozd², T.A. Zapara³, N.N. Dygalo^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Design Technology Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia

Optogenetics, that is, the control of cell activity using light-sensitive ion channels opsins with light of a specific wavelength, is increasingly being used to study activities and functions of neurons. Expression of opsins in the cell membrane, followed by the acquisition by the cell of the sensitivity to light is achieved by means of viral vectors, often created on the basis of lentiviral or adeno-associated (AAV) viruses bearing the nucleotide sequence encoding the photo-channel proteins. Inclusion of the cell-specific promoter of interest into the transgene-expression cassette allows opsin to be produced only in the target cells. The aim of this work was to briefly describe the optogenetic method, as well as to analyze the possibility to use administration of viral vectors into the brain of neonatal animals to study the function of neurons *in vivo* during subsequent periods of development. In this analysis, 3-day-old rat pups received intracerebroventricular injections of optovector (pAAV-CAMKIIa-ChR2_{h134}-YFP), coding for a photo channel, which activates neurons, and the yellow fluorescent marker protein under the CAMKIIa promoter specific for glutamatergic neurons under cold anesthesia. The peak expression of the transferred gene is usually achieved at week 3–5 after the transfer of the vector, which is what was also observed in our experiments. Stimulation of the hippocampal neurons with blue light in the 20-day-old animals, to which optovector was transferred at the 3rd day of life, increased the discharge activity of these neurons. This light stimulation increased expression of the



recognized marker of neuronal activation protein c-Fos in these photosensitive cells too. The same experiments with older animals, 60 days after the neonatal opto-channel gene transfer, revealed no noticeable expression of this channel or photo-activation of target neurons of the hippocampus. Thus, neonatal administration of a viral vector carrying an opto-channel gene is suitable for the study of brain neurons in rats of juvenile age, and requires additional control for gene expression during subsequent periods of development.

Key words: optogenetics; photosensitive proteins; neuronal activity; adeno-associated viruses; ontogeny; expression.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ланшаков Д.А., Дрозд У.С., Запара Т.А., Дыгало Н.Н. Введение оптогенетических векторов в мозг неонатальным животным для исследования функции нейронов в последующие периоды онтогенеза. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):255-261. DOI 10.18699/VJ16.157

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lanshakov D.A., Drozd U.S., Zapara T.A., Dygalo N.N. Transfer of optogenetic vectors into the brain of neonatal animals to study neuron functions during subsequent periods of development. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):255-261. DOI 10.18699/VJ16.157

Прогресс в изучении сложных физиологических систем и признаков, особенно головного мозга, требует новых, все более совершенных методов исследования. До недавнего времени при анализе функций центральной нервной системы (ЦНС) для модуляции активности нейронов использовали лишь фармакологические и электрофизиологические методы. При выяснении механизмов мультигенных и плейотропных признаков возникла необходимость в более избирательных подходах к манипуляции состоянием работающих клеток ЦНС. В настоящее время исследователи располагают обширным набором моделей и методов, таких как трансгенные и нокаутные животные, биотехнологические подходы и недавно получившие широкое распространение методы оптогенетики. В оптогенетической области нейробиологических исследований опубликованы сотни статей, охватывающих широкий спектр функций нейронов и их сетей у самых разнообразных объектов: от нематоды, плодовой мушки и аквариумной рыбки до лабораторных грызунов и даже приматов (Deisseroth, 2011; Diester et al., 2011; Zhao et al., 2011; Дыгало, 2015). Суть оптогенетических подходов состоит в управляемом изменении мембранного потенциала клеток путем активации светом внедренных в их мембрану светочувствительных ионных каналов. Такой подход может быть использован для исследования причинно-следственной связи между активностью определенных нейронов и, например, поведением или экспрессией интересующих исследователя генов. Целью данной работы явилось рассмотрение наиболее часто используемых в настоящее время средств реализации этого подхода, а также анализ особенностей его применения при вирусной доставке оптогенетических векторов в мозг неонатальных животных для исследования функции нейронов *in vivo* в последующие периоды онтогенеза.

Светочувствительные ионные каналы, изменяющие активность нейронов

Оптогенетика использует методы геной инженерии для внедрения в клеточную мембрану исследуемых нейронов

белков, опсинов, способных менять мембранный потенциал клетки в ответ на активацию светом определенной длины волны. Среди опсинов выделяют активаторы, деполяризующие мембрану, и ингибиторы, гиперполяризующие ее. Эти генетические инструменты могут использоваться как по отдельности, так и в сочетании (Glock et al., 2015).

Наиболее часто используются родопсины. Эти белки имеют в своей структуре семь трансмембранных доменов, образующих канал. Они сопряжены с ретиналем, являющимся кофактором этих опсинов. Поглощая фотон, ретиналь изомеризуется, провоцируя изменение конформации белка, что приводит к изменению проницаемости мембраны для ионов, индуцируя ток одновалентных (H^+ , Na^+ , K^+) и небольшого количества некоторых двухвалентных (Ca^{2+}) катионов, вызывающих деполяризацию мембраны нейрона.

Каналородопсин-2 (ChR2) был первым бактериальным белком, использованным для изменения активности нейрона, а именно его деполяризации, а также для управления поведением нематоды *C. elegans* (Boyden et al., 2005). Спектр поглощения ChR2 находится между 350 и 530 нм, тогда как максимальная активация достигается при стимуляции светом с длиной волны около 460 нм (синий свет). После того как канал открывается, он может медленно спонтанно закрываться в темноте, но его закрытие так же может быть индуцировано зеленым светом. Скорость тока ионов через этот канал сравнительно мала (1,21 мс при освещении 20 мВт/мм²) (Lin, 2011), поэтому для достижения функционально значимого результата требуется присутствие большого количества каналов на мембране (Boyden et al., 2005). Сейчас получены каналы с большей светочувствительностью и скоростью тока ионов, но и в настоящее время ChR2 является наиболее используемым в оптогенетических исследованиях. Усовершенствование функций этого канала методами молекулярной инженерии за счет изменения спектральных свойств, проводимости или кинетики этого белка активно ведется в ряде лабораторий. Было показано, например, что

одна точечная мутация (H134R) в гене каналородопсина-2 повышает ток ионов в 2–3 раза за счет замедления деактивации канала (Gradinaru et al., 2007), а C128S мутанты способны деактивироваться под действием импульса зеленого света (542 нм), сохраняя при этом способность активироваться синим светом. Такие свойства могут быть использованы для более точного регулируемого импульсного включения или выключения канала и, соответственно, повышения или снижения активности нейрона (Zhang et al., 2010).

Торможение нейрональной активности впервые было достигнуто с помощью галородопсина (NpHR), найденного в археях *Natronomonas pharaonis* (Zhang et al., 2007). NpHR является насосом, активируемым желтым светом с пиком возбуждения 590 нм. Он индуцирует ток ионов хлора в клетку, гиперполяризуя ее мембрану. В отличие от каналородопсина, который является каналом и в открытом состоянии способен пропускать множество ионов, галородопсин – насос, который способен транспортировать только один ион за один цикл. В связи с этим NpHR имеет низкую скорость работы и нуждается, как и ChR2, в высоком уровне экспрессии для осуществления физиологического эффекта.

В настоящее время для торможения активности нейронов путем гиперполяризации также используются протонные насосы Arch и Mac, которые выкачивают протоны из клетки. Archaeorhodopsin-3 (Arch) был обнаружен в археях *Halorubrum sodomense* (Husson et al., 2012). Этот насос активируется желто-зеленым светом и вызывает самую мощную по сравнению с другими белками гиперполяризацию при освещении светом с длиной волны 566 нм. Mac, найденный в грибе *Leptosphaeria maculans*, активируется сине-зеленым светом (550 нм). В целом эти белки имеют более высокую скорость транспортировки ионов, чем NpHR. Кроме того, спектры активации этих белков позволяют использовать их совместно с ChR2 при мультимодальных стратегиях освещения.

Трансгенные животные в оптогенетических исследованиях

Изучение функции интересующих исследователя нейронов возможно при их активации светом, если эти нейроны имеют в своей мембране ChR2. Для этого создаются трансгенные ChR2 животные, у которых опсин экспрессируется в определенном типе клеток, что обеспечивает специфичный для этих клеток промотор. Такие линии крыс и мышей могут быть использованы для изучения функциональных связей в сложных и еще не известных нейронных цепях в естественных условиях с высоким пространственным и временным разрешением. Уже создано большое число таких линий. Животные этих линий не имеют каких-либо заметных поведенческих или репродуктивных дефектов (Arenkiel et al., 2007; Wang et al., 2007).

Для анализа сложных форм поведения животных с помощью оптогенетической стимуляции применяют контролируемую экспрессию фотоактивируемых белков, которая либо запускается, либо прекращается в ответ на определенный триггер. Такие системы обеспечивают изменение содержания опсинов в контрастных ситуациях поведенческого теста. Для этих целей часто используют

тетрациклиновые Tet-off и Tet-on системы. Tet-off система, например, была успешно использована в эксперименте, нацеленном на выявление клеток, контролирующей реакцию страха у мышей. Трансгенным мышам, экспрессирующим тетрациклиновый активатор tTA под промотором гена раннего ответа c-fos, экспрессия которого является маркером активации нейронов, в гиппокамп вводили вирусную конструкцию, в которой ChR2 находился под промотором, содержащим тетрациклин-отвечающий элемент (TRE). Животным с пищей давали доксициклин (синтетический аналог тетрациклина), который связывается с tTA, что препятствует включению экспрессии ChR2. Как только доксициклин прекращает поступать с пищей, становится возможной экспрессия ChR2, но она происходит только в активированных нейронах, у которых запущен механизм, участником и показателем активности которого является белок c-Fos. В этих опытах незадолго до помещения в стрессовую ситуацию, вызывающую у мышей реакцию страха, им прекращали давать доксициклин, а уже в угрожающей ситуации снова давали данный препарат. Этим обеспечивали экспрессию каналородопсина-2 только в тех нескольких «нейронах страха», которые были активны в ситуации стресса. Однажды запущенная экспрессия ChR2 в этих «нейронах страха» достаточно устойчива, что позволило избирательно активировать их светом. Оптогенетической стимуляции этих нескольких нейронов в условиях, в которых животное обычно не проявляет реакцию страха, было достаточно, чтобы вызвать реакцию страха в спокойной, неугрожающей обстановке (Liu et al., 2012).

Одной из проблем оптогенетики является получение стабильной экспрессии ChR2 под слабым или же жестко регулируемым промотором. Для повышения экспрессии фотоканала его ставят под контроль сильного конститутивного промотора (например, EF1-α), находящегося в обратной ориентации к промотору опсина и фланкированного двумя loxP сайтами, обычным и мутированным (EF1α-DIO-гало/опсин). После восстановления нормальной ориентации Cre-рекомбиназой последовательность, кодирующая мРНК опсина или галородопсина, разворачивается, что обеспечивает высокий уровень экспрессии фотоканала. Часто используются конструкции, в которых после сильного промотора находится stop-кассета, фланкированная loxP сайтами (EF1α-loxSTOP-lox-гало/опсин).

Чтобы добиться сильной специфичной экспрессии опсинов в нейронах тех типов, которые представляют интерес, либо в клетках, экспрессирующих исследуемый ген, используют трансгенных животных, у которых Cre-рекомбиназа экспрессируется только под промотором, работающим исключительно в необходимом типе клеток либо под промотором исследуемого гена. Применяют как введение вирусов (EF1α-DIO-гало/опсин) этим трансгенным животным, экспрессирующим Cre-рекомбиназу, так и скрещивание мышей двух трансгенных линий. При введении вируса в мозг Cre-экспрессирующих трансгенов ген опсина с сильным EF1-α промотором попадает во все клетки в зоне инъекции вирусной конструкции, но лишь в тех клетках, где имеется Cre, произойдет увеличение уровня экспрессии этого гена (Gompe et al., 2015).

Наряду с трансгенными линиями мышей используется вирусная доставка генов опсинов в клетки интересующих исследователя областей головного мозга.

Вирусные векторы доставки опсинов в мозг

Для экспрессии в клетках исследуемых отделов мозга активируемых светом каналов их часто доставляют к этим клеткам в составе ленти- или аденоассоциированных (AAV) вирусов. Эти векторы обеспечивают устойчивую экспрессию доставляемого гена в различных типах клеток при минимальном ответе иммунной системы.

Специфический клеточный промотор способен обеспечить селективную экспрессию опсина в нужных типах нейронов, а также отделах головного мозга. Вирусные векторы на основе ленти- и AAV вирусов могут быть использованы на организмах, для которых полностью недоступны либо имеется лишь ограниченное число трансгенных моделей, например на приматах. Вирусные конструкции способны преодолевать низкую транскрипционную активность некоторых специфичных промоторов путем встраивания множества копий гена. При достаточно высоком титре введенного вируса высокий уровень экспрессии опсина в нейронах достигается через 2–3 недели и может наблюдаться в течение нескольких месяцев. (Dittgen et al., 2004; Zhang et al., 2010; Kim et al., 2013).

Данный подход в сочетании с последними достижениями в фотолитографии позволяет перейти на новый уровень в изучении функций нейронов *in vivo*. Коммерческие компании (Neuronexus, Neuralynx, Omnetics, Atlas Neuroengineering, IMTEK, Multichannel system, Intan Blackrock) предлагают различные многоканальные полупроводниковые (с микроусилителем для каждого канала на плате) оптоотроды (оптоволокно + электрод), при помощи которых возможны одновременные стимуляция светом и запись локальных потенциалов клеток (Davis et al., 2008; Tan et al., 2008). Плотность печати микроплат позволяет вести запись до 256 каналов, регистрируя популяционные спайки малого количества нейронов (Buzsaki et al., 2015). Прогресс в технических науках обеспечил создание микро-оптоволокна, эмитирующего свет с разной длиной волны в разных точках для одновременной стимуляции и ингибирования нейронов, расположенных в зонах эмиссии возбуждающего и тормозного света, что позволяет мультимодально манипулировать различными популяциями нейронов (Pisanello et al., 2014). Имеющиеся оптоотроды и микросхемы достаточно миниатюрны. После вживления в мозг они могут быть закреплены на голове и служить при долговременных хронических опытах на животных, что открыло путь применения оптогенетики для исследования депрессивно-подобного поведения, тревожности, агрессии, памяти, стресса и других функций организма.

Ген *c-fos* в оптогенетических исследованиях

Активацию нейронов в мозге можно выявить не только по частоте и амплитуде их электрических разрядов, но и по всплеску экспрессии генов раннего ответа, таких как *c-fos* или *arc*. Это установлено многими исследователями методами *in situ* гибридизации и иммуногистохимии (Lanshakov et al., 2016). Повышение экспрессии *c-fos*

может наблюдаться уже через 5 мин после активации нейрона, поэтому трансгены и генетические конструкторы на основе промотора *c-fos* часто используются в оптогенетике. Активированные клетки и целые нейронные сети можно маркировать и выявлять по экспрессии *c-fos*, используя трансгенных мышей с репортерным флюоресцентным белком под его промотором. Маркировать активные нейроны позволяет и подход TRAP (Targeted Recombination in Active Populations), включающий два компонента: трансген с ERTCre-рекомбиназой под промотором *c-fos* и трансген (или вирус), который экспрессирует репортерный флюоресцентный белок рекомбиназозависимым образом. В отсутствие тамоксифена Cre-рекомбиназа остается в цитоплазме неактивной, рекомбинация не происходит и белок не экспрессируется. Важно, что неактивные клетки не экспрессируют Cre-рекомбиназу и в них не происходит рекомбинации даже в присутствии тамоксифена. Этот подход отличается более высоким временным разрешением по сравнению с TET-off системой, так как экспрессия *c-fos* происходит только в течение короткого времени после активации нейрона и активность тамоксифена ограничена его метаболизмом и экскрецией. В результате помечаются только те нейроны, которые были активны в течение непродолжительного отрезка времени. (Guenther et al., 2013). Отметим, что все описанные системы, использующие Cre- и ERTCre-рекомбиназы, могут быть совмещены с современными репортерами, такими как флюоресцентные белки, например brainbow, а также генетически кодируемыми фотосенсорами ионов кальция или глутамата.

Ответы на фотостимуляцию клеток, экспрессирующих каналородопсин

Каналородопсины способны осуществлять трансмембранный ток ионов под влиянием фотонов определенной длины волны в клетках любых типов. Это свойство фотоканалов привлекает к ним внимание даже в качестве потенциальных регуляторов сердечной деятельности при экспрессии в кардиомиоцитах (Ambrosi et al., 2015).

Экспрессия использованного в нашей работе каналородопсина H134 *in vitro* в составе плазмиды pAAV-CAMKIIa-ChR2_{H134}-YFP в клетках линии HEK293 эмбриональной почки человека, трансфицированных этой плазмидой при помощи липофектамина, придавала данным клеткам чувствительность к свету. В этих опытах через сутки после трансфекции клетки, экспрессирующие опсин H134, освещали синим светом (480 нм ~ 1,2 мВт/мм²) и измеряли трансмембранный ток методом патч-кламп (Zapara et al., 1989). При освещении клеток наблюдали деполяризацию их мембран, что подтверждает фотоактивность этого опсина (рис. 1).

Для экспериментов *in vivo* вирусные векторы были собраны, очищены и сконцентрированы в лаборатории функциональной нейрогеномики ИЦиГ СО РАН на основе плазмид, созданных группой К. Deisseroth (США). Частицы AAV вирусов смешанных первого и второго серотипов получали, как это принято, путем PEI трансфекции HEK293 клеток смеси плазмид для сборки вирусов pDP1, pDP2 и плазмидой pAAV-CAMKIIa-ChR2_{H134}-YFP, несущей последовательность каналородопсина-2 H134.

Вирусные частицы выделяли на гепарин-сефарозных колонках и концентрировали при помощи центрифужных концентраторов Millipore (США) до титра 10^{11} . В этих векторах экспрессия каналородопсина контролируется промотором САМКПа, активным только в глутаматергических нейронах. В качестве контроля использовали вектор AAV-САМКПа-EGFP, имеющий те же компоненты, что и фотовектор, за исключением фотоканала.

Внедрение генетических конструкций в мозг взрослых грызунов связано с необходимостью проведения сложной операции, включающей трепанацию черепа (Shishkina et al., 2001). Вводить препараты в головной мозг новорожденных или неонатальных животных существенно легче, поскольку их кожные покровы прозрачны, а кости черепа еще не сформированы, как это уже было показано нами ранее (Shishkina et al., 2004; Dygalo et al., 2008). Поэтому использование неонатальных животных для инъекций им в головной мозг векторов, экспрессирующих каналородопсины, для последующего исследования взрослых животных представляет особый интерес.

Для оценки применимости такого подхода с использованием вектора, в котором экспрессия каналородопсина контролируется промотором САМКПа, активным в глутаматергических нейронах, трехдневным крысам под холодовым наркозом в боковые желудочки головного мозга было введено 5 μ l вирусных частиц, кодирующих канал и флюоресцентный маркер, или контрольные вирусные частицы, несущие лишь зеленый флюоресцентный белок.

Через 3 и 9 нед был проведен анализ электрической активности клеток мозга при фотостимуляции. Для этого животных наркотизировали уретаном и помещали в стереотаксис. Через небольшое отверстие в черепе, расположенное над гиппокампом, в его CA1 область вводили 16-канальный оптодод A1 $\times$ 16-5mm-100-177-OA16LP фирмы Neuronexus (США), позволяющий осуществлять оптическую стимуляцию ткани в области расположения окончания оптодод и регистрировать электрическую активность клеток этого участка мозга. Запись популяционных спайков вели с помощью прибора SmartBox компании Neuronexus (США). Стимуляцию светом 1,2 мВт/мм² проводили при помощи фотодиода фирмы Thorlabs (США), дающего синий свет с длиной волны 480 нм. Эксперимент начинали 10-минутной регистрацией фоновой разрядной активности нейронов без фотостимуляции. Последующие 10 мин электрическую активность этих нейронов регистрировали при подаче через оптоволоконно синего света (480 нм $\sim$ 1,2 мВт/мм²), входящее в состав оптодод (рис. 2). Через 3 нед после введения вируса, как отчетливо видно на этом рисунке, при стимуляции мозга светом происходит увеличение электрической активности клеток гиппокампа. Активация гиппокампа неонатальных животных светом подтверждалась и количественным анализом разрядной активности его нейронов (рис. 2, б).

После завершения опто-электрофизиологической части эксперимента стимулирующее действие синего света на клетки дополнительно было определено по общепринятому критерию активации нейронов – повышению экспрессии белка раннего ответа c-Fos. Для этого наркотизированных животных транкардиально перфузировали 1 $\times$ PBS и 4 %-м параформальдегидом (PFA). Извлекали

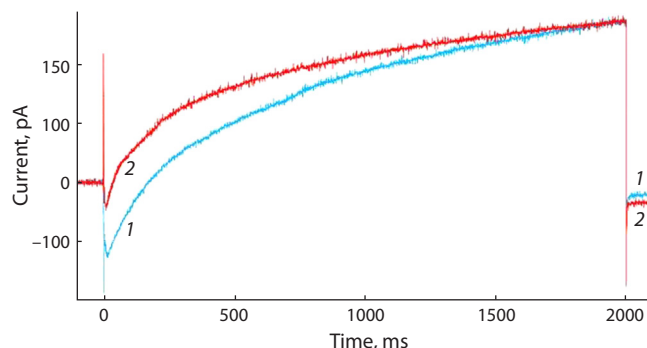


Fig. 1. Whole-cell patch-clamp recordings from HEK293 cell expressing channelrhodopsin-2 H134. Current variation: (1) in response to light of the wavelength 470 nm, (2) in the control.

мозг, постфиксировали 4 ч в 4 %-м PFA и делали 300 μ m срезы на вибраторе. Иммуногистохимию белков проводили согласно общепринятым методикам (Lanshakov et al., 2016). Иммуногистохимический анализ показал, что фотостимуляция разрядной активности нейронов вызывает увеличение экспрессии белка раннего ответа c-Fos в тех же клетках, которые экспрессируют каналородопсин H134.

В отличие от ювенильных животных, в головном мозге взрослых 9-недельных крыс практически не было найдено клеток, экспрессирующих репортер. В согласии с этим у взрослых животных отсутствовал также и ответ со стороны разрядной активности нейронов головного мозга при стимуляции синим светом как *in vivo*, так и на срезах гиппокампа *in vitro*. В большинстве экспериментов с вирусной доставкой опсинов в мозг взрослых животных стимуляцию проводят через 20–30 дн (Stuber et al., 2011; Warden et al., 2012). В некоторых исследованиях конструкции с САМКПа промотором обеспечивали в течение 8–9 нед экспрессию внутриклеточных белков, которые не экспонированы на поверхности клеток (Hioki et al., 2007; Watakabe et al., 2015). Явное снижение количества клеток, экспрессирующих H134 у животных 9-недельного возраста, может объясняться рядом причин. Прежде всего, спустя несколько недель после доставки вектора в клетку обнаруживаются метилирование и инактивация его промотора, что существенно снижает экспрессию регулируемого им гена (Watakabe et al., 2015). С другой стороны, каналородопсин – чужеродный белок, встраивающийся в мембрану нейронов и экспонирующийся на их поверхности, что способно индуцировать развитие реакции микроглии и элиминацию этих клеток. Даже экспрессия внутриклеточного чужеродного белка, обеспеченная его доставкой в клетки мозга AAV2 вирусом, способна, хотя и в меньшей степени, чем доставка AAV9 вирусом, индуцировать элиминацию клеток, экспрессирующих этот белок (Samaranch et al., 2014). Оба предложенных механизма снижения экспрессии H134 у животных 9-недельного возраста представляются вполне реальными, поскольку убедительно показаны на генетических конструкциях, подобных нашей. Таким образом, несмотря на технологичность введения в головной мозг неонатальным животным вектора, экспрессирующего фоточувствительный канал,

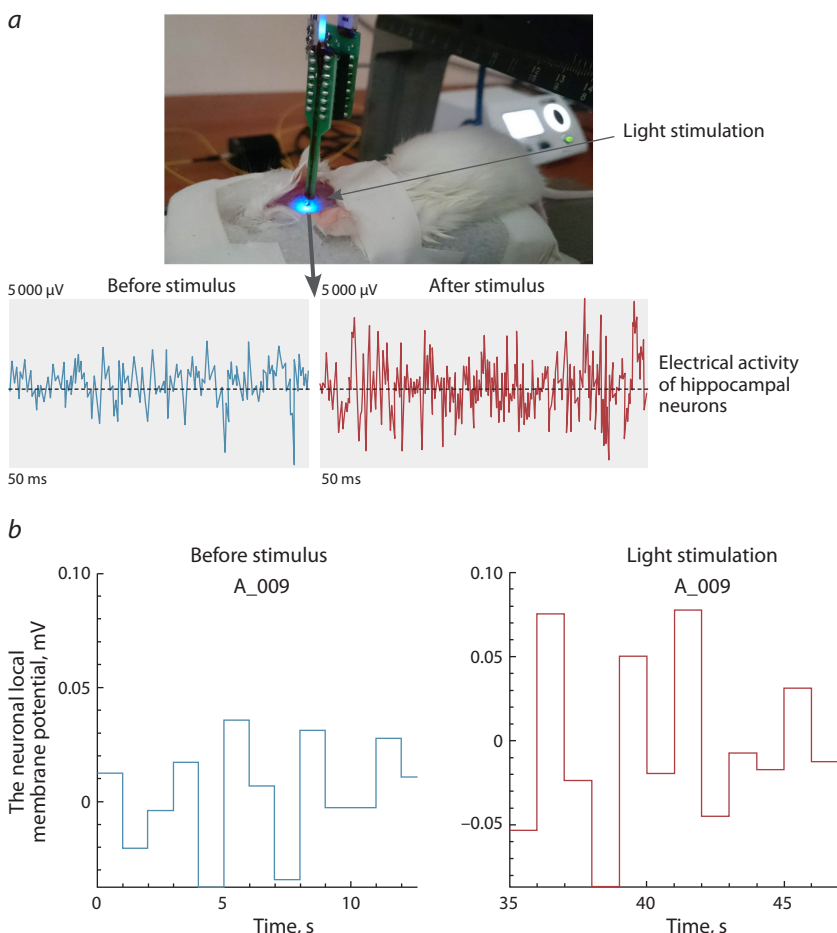


Fig. 2. The electrical activity of hippocampal neurons in juvenile (20-day-old) animals after intracerebroventricular administration of adeno-associated viruses carrying a photosensitive channel and the reporter protein (CAMKIIa-ChR2_{h134}-YFP) during neonatal development before and after stimulation of the neurons with blue light.

(a) The experimental device and example records of the discharge activity of hippocampal neurons. (b) The frequency histogram of the hippocampal neuron activity obtained through channel A_009 of the optotrod and averaged over 1-sec intervals before and after photo stimulation. Y-axis, the neuronal local membrane potential, mV.

применимость этого подхода, по крайней мере относительно используемых в нашей работе конструкторов, имеет ограничение по сроку после вирусной доставки вектора в мозг и может эффективно применяться лишь у ювенильных животных.

Результаты свидетельствуют, что малотравмирующее и нетрудоемкое введение вирусных конструкций в головной мозг новорожденным или неонатальным животным может быть использовано для последующего изучения эффектов оптогенетической активации нейронов ЦНС у животных ювенильного или подросткового возраста. В то же время для оптогенетического управления разрядной активностью нейронов ЦНС взрослых животных и анализа свойств этих клеток необходимо введение векторов, в которых экспрессия каналородопсина контролируется промотором САМКIIa в сроки, предшествующие стимуляции нейронов светом и обеспечивающие проявление высокого уровня экспрессии фотоканала в период исследования.

Acknowledgments

This work was supported by: State Budgeted Project 0324-2015-0004 (sections «Photosensitive ion channels modulating neuron activity» and «Transgenic animals in optogenetic studies»); the Russian Foundation for Basic Research, project 16-

34-60103 (sections «Viral vectors for opsin delivery to the brain» and «The c-fos gene in optogenetic studies»); and the Russian Science Foundation, project 14-15-00115 (section «The response to light stimulation in cells expressing channelrhodopsin»).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ambrosi C.M., Boyle P.M., Chen K., Trayanova N.A., Entcheva E. Optogenetics-enabled assessment of viral gene and cell therapy for restoration of cardiac excitability. *Sci. Rep.* 2015;5(17350). DOI 10.1038/srep17350
- Arenkiel B.R., Peca J., Davison I.G., Feliciano C., Deisseroth K., Augustine G.J., Ehlers M.D., Feng G. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron.* 2007;54(2):205-218. DOI 10.1016/j.neuron.2007.03.005
- Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 2005;8(9):1263-1268. DOI 10.1038/nn1525
- Buzsaki G., Stark E., Berenyi A., Khodagholi D., Kipke D.R., Yoon E., Wise K.D. Tools for probing local circuits: high-density silicon probes combined with optogenetics. *Neuron.* 2015;86(1):92-105. DOI 10.1016/j.neuron.2015.01.028
- Davis B.J., Marks D.L., Ralston T.S., Carney P.S., Boppart S.A. Interferometric synthetic aperture microscopy: Computed imaging for scanned coherent microscopy. *Sensors (Basel).* 2008;8(6):3903-3931. DOI 10.3390/s8063903
- Deisseroth K. Optogenetics. *Nat. Methods.* 2011;8(1):26-29. DOI 10.1038/nmeth.f.324
- Diester I., Kaufman M.T., Mogri M., Paschaie R., Goo W., Yizhar O., Ramakrishnan C., Deisseroth K., Shenoy K.V. An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat. Neurosci.* 2011;14(3):387-397. DOI 10.1038/nn.2749
- Dittgen T., Nimmerjahn A., Komai S., Lienenfeld P., Waters J., Margrie T.W., Helmchen F., Denk W., Brecht M., Osten P. Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101(52):18206-18211. DOI 10.1073/pnas.0407976101
- Dygalo N.N. Optogenetics in Investigations of Brain Mechanisms of Behavior. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk=Advance in Physiological Sciences (Moscow).* 2015;46(2):17-23.
- Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Neonatal programming of rat behavior

- by downregulation of alpha2A-adrenoreceptor gene expression in the brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008;1148:409-414. DOI 10.1196/annals.1410.063
- Glock C., Nagpal J., Gottschalk A. Microbial rhodopsin optogenetic tools: Application for analyses of synaptic transmission and of neuronal network activity in behavior. *Meth. Mol. Biol.* 2015;1327:87-103. DOI 10.1007/978-1-4939-2842-2_8
- Gompf H.S., Budygin E.A., Fuller P.M., Bass C.E. Targeted genetic manipulations of neuronal subtypes using promoter-specific combinatorial AAVs in wild-type animals. *Front. Behav. Neurosci.* 2015;9:152. DOI 10.3389/fnbeh.2015.00152
- Gradinaru V., Thompson K.R., Zhang F., Mogri M., Kay K., Schneider M.B., Deisseroth K. Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 2007;27(52):14231-14238. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3578-07.2007
- Guenther C.J., Miyamichi K., Yang H.H., Heller H.C., Luo L. Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations. *Neuron.* 2013;78(5):773-784. DOI 10.1016/j.neuron.2013.03.025
- Hioeki H., Kameda H., Nakamura H., Okunomiya T., Ohira K., Nakamura K., Kuroda M., Furuta T., Kaneko T. Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. *Gene Ther.* 2007;14(11):872-882. DOI 10.1038/sj.gt.3302924
- Husson S.J., Liewald J.F., Schultheis C., Stirman J.N., Lu H., Gottschalk A. Microbial light-activatable proton pumps as neuronal inhibitors to functionally dissect neuronal networks in *C. elegans*. *PLoS One.* 2012;7(7):e40937. DOI 10.1371/journal.pone.0040937
- Kim J.Y., Ash R.T., Ceballos-Diaz C., Levites Y., Golde T.E., Smirnakis S.M., Jankowsky J.L. Viral transduction of the neonatal brain delivers controllable genetic mosaicism for visualizing and manipulating neuronal circuits in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 2013;37(8):1203-1220. DOI 10.1111/ejn.12126
- Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain. *Neurobiol. Dis.* 2016;91:1-9 DOI 10.1016/j.nbd.2016.02.009
- Lin J.Y. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp. Physiol.* 2011;96(1):19-25. DOI 10.1113/expphysiol.2009.051961
- Liu X., Ramirez S., Pang P.T., Puryear C.B., Govindarajan A., Deisseroth K., Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature.* 2012;484(7394):381-385. DOI 10.1038/nature11028
- Pisanello F., Sileo L., Oldenburg I.A., Pisanello M., Martiradonna L., Assad J.A., Sabatini B.L., De Vittorio M. Multipoint-emitting optical fibers for spatially addressable in vivo optogenetics. *Neuron.* 2014;82(6):1245-1254. DOI 10.1016/j.neuron.2014.04.041
- Samaranch L., San Sebastian W., Kells A.P., Salegio E.A., Heller G., Bringas J.R., Pivrotto P., DeArmond S., Forsayeth J., Bankiewicz K.S. AAV9-mediated expression of a non-self protein in non-human primate central nervous system triggers widespread neuroinflammation driven by antigen-presenting cell transduction. *Mol. Ther.* 2014;22(2):329-337. DOI 10.1038/mt.2013.266
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Attenuation of alpha2A-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood. *Neuroscience.* 2004;129(3):521-528. DOI 10.1016/j.neuroscience.2004.08.015
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Sournina N.Y., Dygalo N.N. Effects of antisense to the (alpha)2A-adrenoceptors administered into the region of the locus ceruleus on behaviors in plus-maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats. *J. Neurosci.* 2001;21(2):726-731.
- Stuber G.D., Sparta D.R., Stamatakis A.M., van Leeuwen W.A., Hardjoprajitno J.E., Cho S., Tye K.M., Kempadoo K.A., Zhang F., Deisseroth K., Bonci A. Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature.* 2011;475(7356):377-380. DOI 10.1038/nature10194
- Tan E.L., Pereles B.D., Horton B., Shao R., Zourob M., Ong K.G. Implantable biosensors for real-time strain and pressure monitoring. *Sensors (Basel).* 2008;8(10):6396-6406. DOI 10.3390/s8106396
- Wang H., Peca J., Matsuzaki M., Matsuzaki K., Noguchi J., Qiu L., Wang D., Zhang F., Boyden E., Deisseroth K., Kasai H., Hall W.C., Feng G., Augustine G.J. High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007;104(19):8143-8148. DOI 10.1073/pnas.0700384104
- Warden M.R., Selimbeyoglu A., Mirzabekov J.J., Lo M., Thompson K.R., Kim S.Y., Adhikari A., Tye K.M., Frank L.M., Deisseroth K. A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature.* 2012;492(7429):428-432. DOI 10.1038/nature11617
- Watakabe A., Ohtsuka M., Kinoshita M., Takaji M., Isa K., Mizukami H., Ozawa K., Isa T., Yamamori T. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci. Res.* 2015;93:144-157. DOI 10.1016/j.neures.2014.09.002
- Zapara G.A., Ratushnyak A.S., Shtark M.B. Local changes in transmembrane ionic currents during plastic reorganizations of electrogenesis of isolated neurons of the pond snail. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1989;19(3):224-229.
- Zhang F., Gradinaru V., Adamantidis A.R., Durand R., Airan R.D., de Lecea L., Deisseroth K. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat. Protoc.* 2010;5(3):439-456. DOI 10.1038/nprot.2009.226
- Zhang F., Wang L.P., Brauner M., Liewald J.F., Kay K., Watzke N., Wood P.G., Bamberg E., Nagel G., Gottschalk A., Deisseroth K. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature.* 2007;446(7136):633-639. DOI 10.1038/nature05744
- Zhao S., Ting J.T., Atallah H.E., Qiu L., Tan J., Gloss B., Augustine G.J., Deisseroth K., Luo M., Graybiel A.M., Feng G. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat. Meth.* 2011;8(9):745-752.

Серотонин и нейропептид FMRFамид играют противоположную роль в регуляции эпигенетических процессов, вовлеченных в формирование долговременной памяти

Л.Н. Гринкевич✉, О.В. Воробьева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Эпигенетические модификации гистонов интенсивно изучаются в связи с механизмами долговременной памяти. Ранее мы показали, что метилирование гистона H3 по активаторным (H3K4me3) и ингибиторным (H3K9me2) сайтам играет важную роль в выработке оборонительного рефлекса пищевой аверзии у наземного моллюска *Helix lucorum*. Было предположено, что данные эпигенетические модификации находятся под контролем как активаторных, так и тормозных путей, вовлеченных в формирование долговременной памяти. Ключевым активаторным медиатором ЦНС моллюсков в формировании оборонительных рефлексов является медиатор серотонин, а тормозным – нейропептид FMRFамид. Инкубация ЦНС с этими веществами моделирует сенситизацию и привыкание соответственно. Оба этих процесса вовлечены в формирование долговременной памяти. С учетом противоположной роли серотонина и FMRFамида в пластичности оборонительных рефлексов нами были проведены сравнительные исследования по влиянию данных нейротрансмиттеров на метилирование гистона H3 в функционально различных ганглиях ЦНС *Helix*. Показано, что серотонин и FMRFамид оказывают реципрокный эффект на метилирование гистона H3 в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС *Helix*, специализирующемся на оборонительном поведении. Так, инкубация ЦНС *Helix* с серотином индуцирует метилирование гистона H3 по активаторным (H3K4me3) и ингибиторным (H3K9me2) сайтам, тогда как инкубация с FMRFамидом снижает метилирование по обоим сайтам. Иную картину метилирования гистона H3 мы наблюдали в церебральных ганглиях, участвующих в обработке сигналов пищевых стимулов. Инкубация ЦНС с серотином не влияла на метилирование гистона H3 по активаторному сайту и снижала метилирование по ингибиторному, а FMRFамид на метилирование гистона H3 влияния не оказывал. Полученные данные свидетельствуют о том, что активаторные и ингибиторные пути, опосредуемые серотином и FMRFамидом, способны взаимодействовать на эпигенетическом уровне через влияние на метилирование гистона H3. Эти эпигенетические изменения могут лежать в основе конвергенции активаторных и тормозных путей, участвующих в формировании долговременной памяти, и влиять на экспрессию генов, необходимых для пластических перестроек.

Ключевые слова: эпигенетика; метилирование гистона H3; серотонин; нейропептид FMRFамид; долговременная память; торможение; моллюск *Helix*.

Opposite roles of serotonin and neuropeptide FMRFamide in the regulation of epigenetic processes involved in the long-term memory formation

L.N. Grinkevich✉, O.V. Vorobiova

Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia

Epigenetic modifications are studied intensively to understand mechanisms of long-term memory. We have shown that histone H3 methylation is important for the defensive reflexes formation in the mollusk *Helix lucorum*. We suggested that these epigenetic modifications are controlled by facilitatory and inhibitory pathways involved in the long-term memory formation. Serotonin and neuropeptide FMRFamide play opposite roles in the formation of defensive reflexes. Serotonin strengthens synaptic connections between neurons of the network, and FMRFamide is an inhibitory transmitter leading to long-term depression. To study the epigenetic regulation of the processes involved in the long-term memory formation, we performed comparative studies on the serotonin and FMRFamide effects on histone H3 methylation in the CNS of the *Helix*. We found that the incubation of the CNS with serotonin induces methylation of histone H3 at both activating (H3K4me3) and inhibitory (H3K9me2) sites, while incubation with FMRFamide has an opposite effect reducing methylation of histone H3 in the subesophageal complex of ganglia, important for defensive behaviour. We observed a different methylation pattern of histone H3 in the cerebral ganglia involved in signal processing of food stimuli, where serotonin did not affect the methylation of histone H3 at the activator site and reduced methylation at the inhibitory site, while FMRFamide had no effect on methylation. The data indicate that the facilitatory and inhibitory processes mediated by serotonin and FMRFamide can interact at the epigenetic level, through histone H3 methylation by activating or inhibiting it, respectively. This may underlie the convergence of the activator and inhibitory pathways involved in the long-term

memory formation and underlie following regulation of the expression of genes involved in long-term plasticity.

Key words: epigenetics; histone H3 methylation; serotonin; FMRFamid; memory formation; inhibition; mollusk *Helix*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гринкевич Л.Н., Воробьева О.В. Серотонин и нейропептид FMRFамид играют противоположную роль в регуляции эпигенетических процессов, вовлеченных в формирование долговременной памяти. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):262-268. DOI 10.18699/VJ16.128

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Grinkevich L.N., Vorobiova O.V. Opposite roles of serotonin and neuropeptide FMRFamide in the regulation of epigenetic processes involved in the long-term memory formation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):262-268. DOI 10.18699/VJ16.128

Одной из сложнейших задач фундаментальной нейробиологии является выяснение роли эпигенетических (надгенетических) механизмов формирования долговременной памяти (ДП). Важнейшую роль в эпигенетической регуляции играет модификация гистонов, приводящая к изменению пространственной структуры хроматина. В результате меняется доступ к ДНК регуляторных белков и, соответственно, индуцируется экспрессия генов или их репрессия (Berger, 2007). При этом ацетилирование гистонов, как правило, приводит к индукции экспрессии генов, а метилирование – как к индукции, так и репрессии, в зависимости от того, какие сайты, по какой аминокислоте и насколько интенсивно метилируются (Berger, 2007; Xu, Andreassi, 2011).

Показано, что эпигенетические модификации гистонов вовлекаются и в формирование долговременной памяти (Levenson, Sweatt, 2006; Wood et al., 2006; Danilova et al., 2010; Gupta et al., 2010; Гринкевич, 2012а, б; Danilova, Grinkevich, 2012; Kandel, 2012). В настоящее время наиболее интенсивно изучается ацетилирование и метилирование гистонов, так как показана принципиальная возможность через воздействие на эти процессы влиять на ментальные характеристики, нарушенные в ряде патологий (Abel, Zukin, 2008; Kurita et al., 2012).

Одним из популярных объектов для изучения молекулярных механизмов памяти являются животные с относительно простой нервной системой, в частности моллюски. Применение модели сенситизации (усиления) синаптической передачи между сенсорными и моторными нейронами моллюска *Aplysia* в культуре позволило Э. Канделу с коллегами открыть и описать ряд базовых механизмов пластичности (Kandel, 2012). На моллюсках также впервые была показана важная роль ацетилирования гистонов в формировании ДП (Guan et al., 2002), что стимулировало в дальнейшем целую серию работ на позвоночных животных (Levenson, Sweatt, 2006). Метилирование гистонов является более сложным процессом, контролируется гистоновыми метилтрансферазами и деметилазами, обладающими высокой специфичностью к определенным сайтам гистонов (Xu, Andreassi, 2011). Изучение метилирования гистонов в связи с участием в пластических перестройках в ЦНС начато значительно позже, чем изучение ацетилирования (Gupta et al., 2010; Гринкевич, 2012б; Jarome, Lubin, 2013).

В качестве модели долговременной памяти мы используем выработку условного рефлекса пищевой аверзии

у моллюска *Helix*. Было показано, что в формирование данного вида ДП вовлекается как ацетилирование, так и метилирование гистона H3, причем метилирование индуцируется как по активаторному, так и ингибиторному сайтам (Гринкевич, 2012б; Danilova, Grinkevich, 2012; Гринкевич, Воробьева, 2014; Grinkevich, Vorobiova, 2014). Было предположено, что данные эпигенетические модификации находятся под контролем как активаторных, так и тормозных путей, вовлеченных в формирование ДП. С нарушением процессов торможения, вызванных недостатком метилирования гистона H3 в промоторах генов ГАМКергической системы, связывают ментальные нарушения, часто присутствующие у больных шизофренией (Akbarian, Huang, 2009). Как известно, γ -аминомасляная кислота (ГАМК) является основным тормозным медиатором нервной системы. С другой стороны, гиперактивация ГАМКергической системы и дефицит когнитивных способностей наблюдаются у пациентов с дефицитом H3K4-деметилазы JARID1C, которая вовлечена в формирование ДП. Ее ингибирование у животных вызывает повышение экспрессии генов, связанных с выбросом ГАМК, и приводит к нарушению долговременной памяти. В норме обучение подавляет экспрессию этих генов (Xu, Andreassi, 2011).

Ключевым активаторным медиатором ЦНС моллюсков в формировании оборонительных рефлексов является модуляторный медиатор серотонин, который опосредует действие ноцицептивных стимулов (Балабан, Захаров, 1992; Grinkevich et al., 2008; Гринкевич, 2012а; Kandel, 2012). Инкубация ЦНС с серотином моделирует процесс сенситизации, являющейся необходимым компонентом формирования условных оборонительных рефлексов. Дисфункция серотонинергической системы приводит к нарушениям в эпигенетической регуляции и невозможности формирования долговременных форм оборонительных рефлексов (Grinkevich et al., 2008; Danilova, Grinkevich, 2012; Гринкевич, Воробьева, 2014; Grinkevich, Vorobiova, 2014). Противоположную роль в пластичности оборонительных рефлексов играет нейропептид FMRFамид (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), который тормозит синаптические реакции у моллюсков *Aplysia* (Belardetti et al., 1987) и *Helix* (Balaban, Chase, 1991). Инкубация ЦНС моллюсков с FMRFамидом моделирует процесс привыкания (депрессии синаптической передачи) (Montarolo et al., 1988).

К настоящему времени описано множество эндогенных FMRFамид-подобных пептидов с общим названием FaRPs

(FMRFamide-related peptides), или RFамиды, которые представлены в ЦНС широкого круга животных, в том числе и позвоночных, идентифицированы их специфические рецепторы и кодирующие эти нейропептиды гены (Raffa, 1988; Zatylny-Gaudin, Favrel, 2014). Спектр действия FMRFамидов широк. Они играют важную роль в развитии нервной системы, вовлечены в регуляцию пищевого поведения и боли (Raffa, 1988; Röszer, Bánfalvi, 2012). Введение FMRFамида позвоночным животным способно вызывать амнезийный эффект (Telegdy, Bollók, 1987). Показано также, что химерные конструкции, включающие опиоиды и FMRFамид-подобные пептиды, способны подавлять боль без развития эффектов привыкания и могут останавливать апоптоз нервных клеток, вызываемый длительным применением опиоидов, что предполагает возможность их применения для обезболивания (Röszer, Bánfalvi, 2012). Однако молекулярные механизмы действия FMRFамидов остаются в значительной мере невыясненными.

Таким образом, представлялось важным провести сравнительные исследования по влиянию серотонина и нейропептида FMRFамида (играющих различную роль в механизмах пластичности) на процессы метилирования гистона H3 в ЦНС *Helix* по активаторному (триметилирование по лизину 4 (H3K4me3)) и ингибиторному (диметилирование по лизину 9 (H3K9me2)) сайтам. Эти модификации гистона H3 приводят к индукции экспрессии или репрессии генов соответственно (Xu, Andreassi, 2011). Для проведения исследования имелись следующие предпосылки: 1) в ЦНС виноградной улитки идентифицировано порядка 1100 FMRFамид-содержащих нейронов (Elekes, Ude, 1993; Kobayashi et al., 2010), среди которых командные нейроны оборонительного поведения, являющиеся основным пластическим звеном условного рефлекса пищевой аверзии, а также нейроны процеребрума, вовлеченного в обработку ольфакторных стимулов; 2) еще в начале 1990-х годов было предположено, что «при функционировании рефлекторной дуги оборонительной реакции происходит противоборство двух систем»: серотониновой, опосредующей действие опасных ноцицептивных стимулов, и FMRFамидной, которая приводит к торможению поведенческой реакции при неопасных для животного стимулах (Балабан, Захаров, 1992), однако молекулярных исследований на эту тему не проводили.

Материалы и методы

Эксперименты по определению влияния серотонина и FMRFамида на эпигенетические процессы в ЦНС виноградных улиток *Helix lucorum* выполняли на взрослых особях. ЦНС *Helix* выделяли, удаляли оболочку и предварительно в течение 30 мин инкубировали в физиологическом растворе для беспозвоночных (80 mM NaCl; 4 mM KCl; 7 mM CaCl₂; 5 mM MgCl₂; 5 mM TRIS-HCl; pH = 7,8), затем в течение 1,5 ч в физиологическом растворе для беспозвоночных, содержащем серотонин (0,2 mM) или FMRFамид (10 мкМ). После этого биологически активные вещества отмывали физиологическим раствором, спустя один час разделяли церебральные и подглоточные комплексы ганглиев, проводили гомогенизацию

и подготовку образцов согласно М. Монси с коллегами (Monsey et al., 2011). Исследования модификации гистонов осуществляли методом Вестерн-блот анализа. Экстракты, содержащие искомые белки, разделяли электрофорезом в 14 %-м полиакриламидном геле (система Лэмли). Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозные фильтры, которые после проведения процедур, уменьшающих неспецифическую сорбцию (инкубация с 3 %-м молоком), последовательно инкубировали в растворах, содержащих первичные и вторичные (конъюгированные с пероксидазой хрена) антитела. Инкубацию с первичными антителами осуществляли в течение ночи при 4 °С. Визуализацию и количественный анализ связавшихся антител проводили с использованием хемоллюминесцентного метода (система ECL, фирма «Amersham»). Рентгеновские пленки сканировали. Количественный анализ осуществляли при помощи компьютерной программы Gel-Pro Analyzer.

Для оценки степени метилирования применяли антитела к гистону H3, триметилированному по лизину 4 (H3K4me3), и антитела к гистону H3, диметилированному по лизину 9 (H3K9me2). Для оценки содержания гистонов применяли антитела к тотальным формам гистона H3. Все использованные антитела произведены фирмой Upstate Biotechnology (США). Для каждого электрофореза рассчитывали отношения связывания антител к модифицированным формам гистона к тотальным формам. Контроли усредняли, после чего в каждом электрофорезе рассчитывали отношение к среднему контролю. Статистическую обработку проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты

Анализ влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 проводили в подглоточном и церебральном комплексах ганглиев ЦНС *Helix*. Подглоточный комплекс ганглиев составляет большую часть ЦНС моллюсков и контролирует оборонительное поведение. В нем находятся сенсорные, моторные, командные и модуляторные нейроны, включенные в сеть оборонительных рефлексов. В церебральных ганглиях обрабатывается информация, приходящая со стороны пищевых стимулов. Нейроны обоих комплексов ганглиев вовлечены в формирование условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии (Балабан, Захаров, 1992). Анализ статуса метилирования гистона H3 проводили по активаторным и ингибиторным сайтам спустя 1 ч после 1,5-часовой инкубации ЦНС с серотонином или FMRFамидом. Данное время инкубации вызывает долговременные изменения эффективности синаптической передачи в нейрональной сети оборонительных рефлексов. Инкубация ЦНС с серотонином в течение данного времени моделирует процесс долговременной сенситизации, а с FMRFамидом – процесс долговременной синаптической депрессии. В качестве контроля использовали ЦНС, которую инкубировали в физиологическом растворе для беспозвоночных, не содержащем серотонин или FMRFамид.

Анализ влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 по активаторному сайту (H3K4me3) в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС *Helix*

Для оценки метилирования гистона H3 по активаторному сайту применяли антитела к гистону H3, триметилированному по лизину 4 (H3K4me3). Эти модификации гистона H3 приводят к индукции экспрессии генов. Для оценки содержания гистона H3 использовали антитела к тотальным формам этого гистона. Исследования показали, что спустя 1 ч после инкубации ЦНС с серотином происходит индукция метилирования гистона H3 по лизину 4 (H3K4me3). Уровень метилирования составляет $1,31 \pm 0,11$ относительно контроля. Достоверно при $p < 0,02$ (рис. 1, а).

Противоположная картина наблюдается при инкубации ЦНС с нейропептидом FMRFамидом. Степень метилирования гистона H3 по лизину 4 под влиянием FMRFамида снижается. Уровень метилирования составляет $0,83 \pm 0,02$. Достоверно при $p < 0,01$ (рис. 1, б).

Анализ влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 по ингибиторному сайту (H3K9me2) в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС *Helix*

Для анализа влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 по ингибиторному сайту исследовали статус метилирования гистона H3 спустя 1 ч после 1,5-часовой инкубации ЦНС с серотином или FMRFамидом. Для оценки метилирования гистона H3 по ингибиторному сайту применяли антитела к гистону H3, диметилированному по лизину 9 (H3K9me2). Эти модификации гистона H3 приводят к репрессии генов. Показано, что спустя 1 ч после инкубации ЦНС с серотином наблюдается индукция метилирования гистона H3 по ингибиторному сайту (H3K9me2). Уровень метилирования составляет $1,38 \pm 0,07$ по отношению к контролю. Достоверно при $p < 0,001$ (рис. 2, а).

Исследование влияния FMRFамида на метилирование гистона H3 продемонстрировало противоположную картину. Степень метилирования гистона H3 под влиянием инкубации ЦНС с FMRFамидом снижалась по изучаемому ингибиторному сайту (рис. 2, б) и составляла $0,84 \pm 0,06$ ($p < 0,001$).

Таким образом, инкубация ЦНС *Helix* с серотином в течение 1,5 ч приводит к индукции метилирования гистона H3 в подглоточном комплексе ганглиев, причем как по активаторному, так и ингибиторному сайтам. Инкубация ЦНС *Helix* с FMRFамидом вызывает снижение метилирования гистона H3 в подглоточном комплексе ганглиев по обоим сайтам.

Анализ влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 в церебральном комплексе ганглиев ЦНС *Helix*

Для анализа влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 в церебральном комплексе ганглиев исследовали статус метилирования гистона H3 по активаторному и ингибиторному сайтам спустя 1 ч после 1,5-часовой инкубации ЦНС с серотином или FMRFамидом. Для каждой точки $N = 6$.

Исследования показали, что инкубация ЦНС с серотином не оказывает влияния на степень метилирования гистона H3 в церебральных ганглиях по активаторному сайту (H3K4me3): $0,90 \pm 0,08$; $p = 0,24$, тогда как по ингибиторному сайту (H3K9me2) наблюдается снижение метилирования ($0,65 \pm 0,12$) по отношению к контролю ($p < 0,03$). Под влиянием FMRFамида степень метилирования гистона H3 в церебральных ганглиях не изменялась ни по активаторному, ни по ингибиторным сайтам и составляла по активаторному сайту (H3K4me3) $0,94 \pm 0,09$ относительно контроля ($p = 0,54$), а по ингибиторному (H3K9me2) $1,06 \pm 0,14$ ($p = 0,67$).

Таким образом, в церебральных ганглиях инкубация ЦНС с серотином не оказывала влияния на степень метилирования гистона H3 по активаторному сайту, однако индуцировала снижение метилирования по ингибиторному.

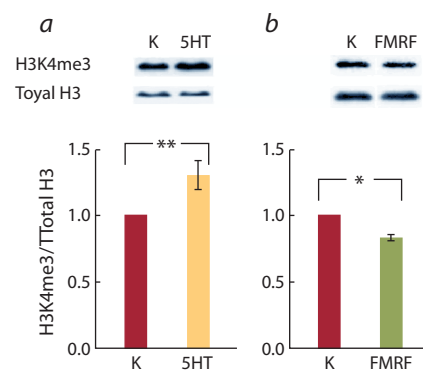


Fig. 1. Serotonin and FMRFamide exert opposite effects on histone H3 methylation at the activator (H3K4me3) site of the subesophageal ganglion complex in *Helix*. Top: representative Western blotting image with antibodies against methylated histone H3 (H3K4me3) and total histone H3 (Total H3). K, control; 5HT, CNS incubation with serotonin; FMRF, CNS incubation with FMRFamide; H3K4me3, H3 trimethylated at lysine 4. Y-axis: the proportion of the methylated H3 form with respect to the total amount of histone and to the control. For each point, $N = 6$. Significant differences: * $p < 0,01$; ** $p < 0,02$ (t-test).

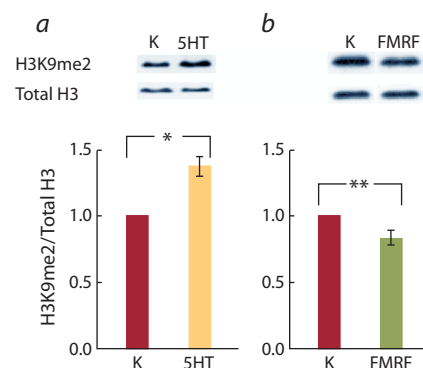


Fig. 2. Serotonin and FMRFamide exert opposite effects on histone H3 methylation at the inhibitory (H3K9me2) site of the subesophageal ganglion complex in *Helix*. Top: representative Western blotting image with antibodies against methylated histone H3 (H3K9me2) and total histone H3 (Total H3). K, control; 5HT, CNS incubation with serotonin; FMRF, CNS incubation with FMRFamide. Y-axis: the proportion of the methylated H3 form with respect to the total amount of histone and to the control. H3K9me2, H3 dimethylated at lysine 9. For each point, $N = 6$. Significant differences: * $p < 0,001$; ** $p < 0,02$ (t-test).

Инкубация ЦНС с FMRФамидом не влияла на степень метилирования гистона H3 ни по одному из исследованных сайтов.

Обсуждение

С целью изучения влияния активаторных и ингибиторных путей на эпигенетические процессы в ЦНС мы провели сравнительный анализ влияния серотонина и тормозного нейропептида FMRФамида на метилирование гистона H3 в функционально отличных ганглиях ЦНС *Helix*. Показано, что серотонин и FMRФамид оказывают противоположный эффект на метилирование гистона H3 в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС, специализирующемся на оборонительном поведении. Так, инкубация ЦНС *Helix* с серотонином в течение 1,5 ч приводит к значительной индукции метилирования гистона H3 спустя час после инкубации, причем как по активаторному (H3K4me3), так и ингибиторному (H3K9me2) сайтам, тогда как инкубация ЦНС *Helix* с FMRФамидом в течение 1,5 ч снижает метилирование по обоим сайтам. Как отмечалось выше, эти биологически активные вещества играют противоположную роль в формировании оборонительных рефлексов моллюсков. Серотонин индуцирует усиление синаптической связи между нейронами данной сети, а нейропептид FMRФамид является тормозным медиатором, вовлеченным в формирование привыкания. Инкубация с этими веществами в течении 1,5 ч моделирует долговременную сенситизацию и привыкание соответственно. Сенситизация и привыкание относятся к неассоциативным формам обучения и вовлекаются в формирование условных оборонительных рефлексов (Kandel, 2012).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что серотонин и FMRФамид могут оказывать свое действие на работу генома в подглоточных ганглиях ЦНС через одни и те же мишени, а именно через изменение уровня метилирования гистона H3. Однако эффект их действия разнонаправленный. При этом активационные процессы, опосредуемые серотонином, активируют метилирование и по активаторным, и по ингибиторным сайтам, а тормозные, опосредуемые FMRФамидом, ингибируют метилирование по обоим сайтам. Синхронную активацию метилирования гистона H3 по активаторным и ингибиторным сайтам, как и в случае инкубации ЦНС с серотонином, мы наблюдали ранее при выработке рефлекса пищевой аверзии в условиях *in vivo* (Гринкевич, 2012б). Сходные данные по синхронному метилированию активаторных и ингибиторных сайтов в аналогичные временные интервалы были получены и при выработке условных рефлексов у высших позвоночных (Gupta et al., 2010; Morse et al., 2015). Как отмечалось выше, метилирование гистонов способно влиять как на индукцию экспрессии генов, так и их репрессию, в зависимости от того, какие сайты метилируются, активаторные или ингибиторные. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в формирование как условных оборонительных рефлексов, так и долговременных форм сенситизации вовлекаются не только активация экспрессии генов, но и ингибирование. Оценочные эксперименты на позвоночных животных показывают, что количество генов, экспрессия которых активируется или снижается

при формировании ДП, практически совпадает (этих генов около 1500) (Gupta-Agarwal et al., 2012).

Что же касается долговременной депрессии, индуцируемой FMRФамидом, то деметилирование активаторных сайтов может приводить к ингибированию экспрессии генов (в том числе, возможно, включенных в формирование сенситизации), а деметилирование ингибиторных, наоборот, активировать гены, необходимые для формирования долговременной депрессии.

Несколько иную картину метилирования гистона H3 мы наблюдали в церебральных ганглиях, вовлеченных в обработку сигналов ольфакторных и пищевых стимулов, используемых при формировании оборонительного рефлекса пищевой аверзии в качестве условных. Инкубация ЦНС с серотонином не влияла на метилирование гистона H3 по активаторному сайту и снижала его по ингибиторному, т.е. в церебральных ганглиях серотонин в целом, вероятно, активирует экспрессию генов через выключение ингибиторных сайтов. FMRФамид в исследованный временной интервал не оказывает влияние на метилирование гистона H3 в церебральных ганглиях ни по одному из исследованных сайтов. Таким образом, серотонин и FMRФамид избирательно влияют на эпигенетические процессы в функционально различных ганглиях.

Следует отметить, что в отличие от серотонина (Балабан, Захаров, 1992; Grinkevich et al., 2008; Kandel, 2012; Гринкевич, Воробьева, 2014; Grinkevich, Vorobiova, 2014) функции FMRФамидов и механизмы их воздействия на внутриклеточные процессы остаются еще плохо изученными. Наиболее полно описано действие FMRФамида на формирование долговременной депрессии ингибиторной связи между нейронами моллюска *Aplysia* в культуре (Guan et al., 2002). Показано, что FMRФамид индуцирует формирование долговременной депрессии через влияние на фосфорилирование K⁺ каналов S-типа (Belardetti et al., 1987) и более того, способен подавлять серотонин-зависимую долговременную сенситизацию (фасилитацию), связанную с усилением ацетилирования гистона H4 через его деацетилирование и вовлечение ингибиторного транскрипционного фактора CREB2 (Guan et al., 2002). Таким образом, из данных работ следует, что сенситизация, лежащая в основе формирования условных оборонительных рефлексов, может быть подавлена эндогенным ингибиторным нейропептидом FMRФамидом, т.е. в ряде случаев процессы торможения могут доминировать над активационными. Наши впервые полученные данные по метилированию гистона H3 в условиях инкубации ЦНС *Helix* с FMRФамидом свидетельствуют о том, что FMRФамид способен влиять на эпигенетические процессы через ингибирование не только ацетилирования гистона H4, но и метилирования гистона H3, причем в нашем случае также наблюдаются реципрокные отношения с серотонином. Способность FMRФамида оказывать противоположный серотонину эффект на метилирование гистона H3 может отражать роль FMRФамида в целостном поведении животного, а именно в торможении стимулов, утративших значимость в том числе и при формировании условных рефлексов. Вовлечение FMRФамид-подобных пептидов в формирование привыкания было показано для нематоды (Li et al., 2013), однако эпигенетические исследе-

дования в данной работе не проводили. Полученные нами данные о вовлечении FMRFамида в регуляцию метилирования гистонов расширяют базовые знания о механизмах воздействия пептидов на функционирование ЦНС.

Отметим, что механизмы индукции процессов метилирования гистонов при формировании ДП остаются еще практически неисследованными. Первая работа по вовлечению метилирования в формирование ДП была опубликована в 2010 г. Было показано, что метилирование гистона H3 по активаторным и ингибиторным сайтам вовлечено в формирование условных оборонительных рефлексов у крыс (Gupta et al., 2010), а у мышей, лишенных H3K4-специфической гистоновой метилтрансферазы *Mll*, данный вид ДП не формируется (Akbarian, Huang, 2009). Нарушение метилирования гистонов наблюдается и при возрастных ухудшениях ДП. И что важно, память в данном случае может быть значительно улучшена через нормализацию метилирования путем предварительного содержания животных в условиях обогащенной различными предметами среды (Morse et al., 2015). К настоящему времени идентифицировано несколько десятков специфических гистоновых лизин метилтрансфераз и деметилаз, которые контролируют метилирование и деметилирование определенных специфических сайтов гистонов. Часть из них вовлекается в формирование ДП (Gupta et al., 2010; Xu, Andreassi, 2011; Gupta-Agarwal et al., 2014). Механизмы привлечения данных ферментов к определенным регуляторным районам генов остаются практически неисследованными в связи как с многообразием регуляторных систем, вовлеченных в формирование ДП, так и наличием большого числа форм ферментов с различными уровнями экспрессии в разных клетках и специфичностью их сродства к различным сайтам гистонов. Опубликована первая работа, показывающая участие сигнального каскада MAPK/ERK (The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) в индукции метилирования гистона H3 по ингибиторному сайту H3K9me2 при формировании ДП, вызываемой страхом. При этом происходит двунаправленная регуляция формирования комплекса H3K9me2-специфической метилтрансферазы (G9a) и деметилазы (LSD1) на промоторах генов, а ингибирование этих ферментов приводит к угнетению или улучшению формирования ДП соответственно (Gupta-Agarwal et al., 2014). Следует отметить, что MAPK/ERK каскад играет чрезвычайно важную роль в формировании долговременной памяти как у позвоночных животных, так и беспозвоночных (Levenson, Sweatt, 2006; Wood et al., 2006; Grinkevich et al., 2008).

Индукция метилирования гистона H3 как при обучении *Helix*, так и при инкубации ЦНС с серотонином может осуществляться через MAPK/ERK. Ранее мы показали, что MAPK/ERK активируется при обучении *Helix*, и эта активация серотонин-зависима (Grinkevich et al., 2008). Блокада MAPK/ERK каскада приводит к неспособности формирования ДП и сопровождается снижением ацетилирования гистона H3, индуцируемого обучением (Danilova et al., 2010; Grinkevich, 2012a; Danilova, Grinkevich, 2012). Известно, что MAPK/ERK каскад играет важную роль в индукции ацетилирования через активацию ацетилтрансфераз фосфорилированием (Гринкевич,

2012a). С другой стороны, в литературе имеются данные о влиянии ацетилирования на метилирование гистонов (Akbarian, Huang, 2009; Gupta et al., 2010). Таким образом, гипотетически серотонин может индуцировать метилирование по активаторному сайту через ERK-зависимое ацетилирование гистона H3, а по ингибиторному сайту — через ERK-зависимое ингибирование деметилаз аналогично описанному в работе Gupta-Agarwal et al., 2014. В литературе имеются данные о вовлечении фосфорилирования в функционирование гистоновых деметилаз (Toffolo et al., 2014). Способность серотонина индуцировать метилирование гистона H3 по ингибиторному сайту лизина 9 показана для гиппокампа (Hunter et al., 2009). Что же касается FMRFамида, то его действие на геном, по крайней мере у моллюсков, может опосредоваться через протеинкиназный каскад p38, который потенциально способен ингибировать метилирование по активаторным (и возможно, ингибиторным) сайтам через привлечение к регуляторным комплексам генов деметилаз (Guan et al., 2002). На позвоночных животных показано, что деметилаза LSD1 вовлекается в деметилирование как активаторного H3K4, так и ингибиторного H3K9 сайтов гистона H3 (Xu, Andreassi, 2011), метилирование которых изучалось и нами в настоящем и предыдущих исследованиях (Гринкевич, 2012b; Гринкевич, Воробьева, 2014; Grinkevich, Vorobiova, 2014). FMRFамид теоретически способен ингибировать метилирование гистона H3 и через ингибирование регуляторного каскада MAPK/ERK посредством активации протеинкиназы p38. Показано, что p38-зависимое ингибирование MAPK/ERK вовлечено в формирование FMRFамид-зависимой депрессии у моллюска *Aplysia* (Fioravante et al., 2006). Кроме того, FMRFамид способен влиять на внутриклеточные процессы через регуляцию синтеза оксида азота (NO) (Röszer et al., 2004), который широко вовлекается в формирование ДП (Korneev et al., 2005).

Полученные данные свидетельствуют о том, что активаторные и ингибиторные процессы, опосредуемые серотонином и FMRFамидом, могут взаимодействовать на эпигенетическом уровне, активируя или ингибируя метилирование гистона H3 соответственно. Таким образом, эпигенетические модификации гистонов могут лежать в основе конвергенции активаторных и тормозных путей, участвующих в формировании долговременной памяти, и, соответственно, регулировать экспрессию генов, вовлекаемых в пластические перестройки.

Изучению метилирования гистонов в функционировании ЦНС в настоящее время придается исключительно важное значение как в связи с участием метилирования в ментальных процессах, так и с потенциальной возможностью восстановления когнитивных функций, связанных с нарушением метилирования. Наибольшее число работ в этой области посвящено исследованию механизмов нарушения ДП и их восстановлению при депрессиях, аутизме и нейродегенеративных патологиях (Akbarian, Huang, 2009; Xu, Andreassi, 2011; Jarome, Lubin, 2013).

Дальнейшие исследования взаимодействия серотонин-индуцируемых и FMRFамидных сигнальных путей на уровне эпигенетической модификации гистонов могут пролить свет на механизмы конвергенции регуляторных систем, вовлеченных в формирование долговременной памяти.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-01681.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abel T., Zukin R.S. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008; 8(1):57-64.
- Akbarian S., Huang H.S. Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation. *Biol. Psychiatry.* 2009;65(3):198-203.
- Balaban P.M., Chase R. Interrelationships of the emotionally positive and negative regions of the brain of the edible snail. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1991;21(2):172-180.
- Balaban P.M., Zakharov I.S. Obuchenie i razvitiye: obshchaya osnova dvukh yavleniy [Learning and Development: the Common Ground of Two Phenomena]. Moscow, Nauka, 1992.
- Belardetti F., Kandel E.R., Siegelbaum S.A. Neuronal inhibition by the peptide FMRFamide involves opening of S K⁺ channels. *Nature.* 1987;325(7000):153-156.
- Berger S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 2007;447:407-412.
- Danilova A.B., Grinkevich L.N. Inability of juvenile snails for long-term memory formation depends on acetylation status of histone H3 and can be improved by NaB treatment. *PLoS ONE.* 2012;7(7): e41828:1-8.
- Danilova A.B., Kharchenko O.A., Shevchenko K.G., Grinkevich L.N. Histone H3 acetylation is asymmetrically induced upon learning in identified neurons of the food aversion network in the mollusk *Helix lucorum*. *Front. Behav. Neurosci.* 2010;4(180):1-7.
- Elekes K., Ude J. An immunogold electron microscopic analysis of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the CNS of *Helix pomatia*: ultrastructure and synaptic connections. *J. Neurocytol.* 1993; 22(1):1-13.
- Fioravante D., Smolen P.D., Byrne J.H. The 5-HT- and FMRFa-activated signaling pathways interact at the level of the Erk MAPK cascade: potential inhibitory constraints on memory formation. *Neurosci Lett.* 2006;396(3):235-240.
- Grinkevich L.N. Epigenetics and long-term memory formation. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*=Russian Journal of Physiology. 2012a;98(5):553-574
- Grinkevich L.N. Study of histone H3 methylation in long-term memory formation. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*=Russian Journal of Physiology. 2012b;98(9):1111-1118.
- Grinkevich L.N., Lisachev P.D., Kharchenko O.A., Vasil'ev G.V. Expression of MAP/ERK kinase cascade corresponds to the ability to develop food aversion in terrestrial snail at different stages of ontogenesis. *Brain Res.* 2008;1187:12-19.
- Grinkevich L.N., Vorobiova O.V. Role of modulatory mediator serotonin in induction of epigenetic processes during long-term memory formation in *Helix*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2014;4(6):526-532.
- Grinkevich L.N., Vorobiova O.V. Role of the modulatory mediator serotonin in the induction of epigenetic processes during long-term memory formation in *Helix*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(2):298-307.
- Guan Z., Giustetto M., Lomvardas S., Kim J.H., Miniaci M.C., Schwartz J.H., Thanos D., Kandel E.R. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell.* 2002;111(4):483-493.
- Gupta S., Kim S.Y., Artis S., Molfese D.L., Schumacher A., Sweatt J.D., Paylor R.E., Lubin F.D. Histone methylation regulates memory formation. *J. Neurosci.* 2010;30(10):3589-3599.
- Gupta-Agarwal S., Franklin A.V., Deramus T., Wheelock M., Davis R.L., McMahon L.L., Lubin F.D. G9a/GLP histone lysine dimethyltransferase complex activity in the hippocampus and the entorhinal cortex is required for gene activation and silencing during memory consolidation. *J. Neurosci.* 2012;32(16):5440-5453.
- Gupta-Agarwal S., Jarome T.J., Fernandez J., Lubin F.D. NMDA receptor- and ERK-dependent histone methylation changes in the lateral amygdala bidirectionally regulate fear memory formation. *Learn. Mem.* 2014;21(7):351-362.
- Hunter R.G., McCarthy K.J., Milne T.A., Pfaff D.W., McEwen B.S. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106(49):20912-20917.
- Jarome T.J., Lubin F.D. Histone lysine methylation: critical regulator of memory and behavior. *Rev. Neurosci.* 2013;24(4):375-387.
- Kandel E. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. *Mol. Brain.* 2012;5(14):1-12.
- Kobayashi S., Hattori M., Elekes K., Ito E., Matsuo R. FMRFamide regulates oscillatory activity of the olfactory center in the slug. *Eur. J. Neurosci.* 2010;32(7):1180-1192.
- Korneev S.A., Straub V., Kemenes I., Korneeva E.I., Ott S.R., Benjamin P.R., O'Shea M. Timed and targeted differential regulation of nitric oxide synthase (NOS) and anti-NOS genes by reward conditioning leading to long-term memory formation. *J. Neurosci.* 2005; 25(5):1188-1192.
- Kurita M., Holloway T., García-Bea A., Kozlenkov A., Friedman A.K., Moreno J.L., Heshmati M., Golden S.A., Kennedy P.J., Takahashi N., Dietz D.M., Mocci G., Gabilondo A.M., Hanks J., Umali A., Callado L.F., Gallitano A.L., Neve R.L., Shen L., Buxbaum J.D., Han M.H., Nestler E.J., Meana J.J., Russo S.J., González-Maeso J. HDAC2 regulates atypical antipsychotic responses through the modulation of mGlu2 promoter activity. *Nat. Neurosci.* 2012;15(9):1245-1254.
- Levenson J.M., Sweatt J.D. Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cell Mol. Life Sci.* 2006;63:1009-1016.
- Li C., Timbers T.A., Rose J.K., Bozorgmehr T., Rankin C.H. The FMRFamide-related neuropeptide FLP-20 is required in the mechanosensory neurons during memory for massed training in *C. elegans*. *Learn. Mem.* 2013;20(2):103-108.
- Monsey M.S., Ota K.T., Akingbade I.F., Hong E.S., Schafe G.E. Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PLoS One.* 2011;6(5): 1-13.
- Montarolo P.G., Kandel E.R., Schacher S. Long-term heterosynaptic inhibition in *Aplysia*. *Nature.* 1988;333(6169):171-174.
- Morse S.J., Butler A.A., Davis R.L., Soller I.J., Lubin F.D. Environmental enrichment reverses histone methylation changes in the aged hippocampus and restores age-related memory deficits. *Biology (Basel).* 2015;4(2):298-313.
- Raffa R.B. The action of FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) and related peptides on mammals. *Peptides.* 1988;9(4):915-922.
- Röszer T., Bánfalvi G. FMRFamide-related peptides: anti-opiate transmitters acting in apoptosis. *Peptides.* 2012;34(1):177-185.
- Röszer T., Jenei Z., Gáll T., Nagy O., Czimmerer Z., Serfőző Z., Elekes K., Bánfalvi G. A possible stimulatory effect of FMRFamide on neural nitric oxide production in the central nervous system of *Helix lucorum*. *Brain Behav. Evol.* 2004;63(1):23-33.
- Telegdy G., Bollók I. Amnesic action of FMRFamide in rats. *Neuropeptides.* 1987;10(2):157-163.
- Toffolo E., Rusconi F., Paganini L., Tortorici M., Pilotto S., Heise C., Verpelli C., Tedeschi G., Maffioli E., Sala C., Mattevi A., Battaglioli E. Phosphorylation of neuronal Lysine-Specific Demethylase 1LSD1/KDM1A impairs transcriptional repression by regulating interaction with CoREST and histone deacetylases HDAC1/2. *J. Neurochem.* 2014;128(5):603-616.
- Wood M.A., Hawk J.D., Abel T. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: A code for memory. *Learn. Mem.* 2006; 13:241-244.
- Xu J., Andreassi M. Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. *Horm. Behav.* 2011;59(3):383-392.
- Zatylny-Gaudin C., Favrel P. Diversity of the RFamide peptide family in mollusks. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2014;5(178):1-14.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

Открытый доступ к полным текстам:
на платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

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

Проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева

Подписано в печать 21.04.2016 г. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 16,04. Уч.-изд. л. 22,5

Тираж 200 экз. Заказ № 98

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