

japonica на пролиферативную и цитотоксическую активности спленоцитов мышей *in vitro*.

Выделение и изучение химической структуры фукоиданов из бурых водорослей проведено в ФГБУ ТИБОХ им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

Исследования проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Полученные результаты пролиферативной активности в реакции бласттрансформации показали, что наибольшим действием обладает частично ацетилированный фукоидан из *F. evanescens* (М.м. 40-60 кДа), состоящий из последовательно чередующихся 1 → 3- и 1 → 4-связанных остатков α-L-фукопиранозы. Инкубирование фукоидана со спленоцитами мышей линии СВА в концентрации 100 и 50 мкг/мл способствует увеличению индекса стимуляции (ИС) в среднем в 3,59 ± 0,5 раза (65,6 ± 1,8 и 54,0 ± 1,9 соответственно) по сравнению с контролем (16,6 ± 0,7), а в концентрации 10 мкг/мл ИС = 1,98 (32,8 ± 1,3; $p \leq 0,01$).

Высокосульфатированный фукоидан из *L. cichorioides* (М.м. 40-80 кДа), состоящий только из 1 → 3-связанных остатков α-L-фукопиранозы и низкосульфатированный, частично ацетилированный фукоидан из *L. japonica* (М.м. 10-30 кДа), отличающийся высоким содержанием галактозы, также способствовали увеличению количества бластных форм, с преобладанием в культуре крупных клеток типа пролимфоцитов, что свидетельствует об активации под влиянием полисахаридов пролиферативной активности спленоцитов. Установлено, что фукоиданы из *L. cichorioides* и *L. japonica* в концентрации 100 мкг/мл способствуют увеличению бласттрансформации в среднем в 2 раза (38,8 ± 1,9 и 34,6 ± 2,7 соответственно) по сравнению с контролем, в концентрации 50 мкг/мл ИС = 1,9 и 1,84 (31,8 ± 0,9 и 30,2 ± 2,1; $p \leq 0,01$), а в дозе 10 мкг/мл ИС составил 1,76 и 1,3 (28,6 ± 1,2 и 22,6 ± 2,5; $p \leq 0,01$ и 0,05 соответственно).

Способность фукоиданов индуцировать НК-активность спленоцитов мышей была исследована в цитотоксическом тесте (МТТ-тест) на чувствительной линии клеток эритробластного лейкоза человека K562 (соотношение клетки-мишени/эффекторы 1:5).

Установлено, что культивирование спленоцитов с фукоиданами из *F. evanescens* и *L. japonica* в концентрации 100 мкг/мл способствует увеличению значений киллерной активности в 2 раза (64,3 ± 3,6 и 60,9 ± 2,7; $p \leq 0,01$) по сравнению с контролем (29,4 ± 1,5), а в концентрации 50 и 10 мкг/мл – в 1,8 ± 0,1 и 1,68 ± 0,12 раза ($p \leq 0,01$). Наиболее выраженный цитотоксический эффект выявлен при внесении в среду культивирования фукоидана из *L. cichorioides*. Установлено, что фукоидан в концентрации 100 и 50 мкг/мл способствует увеличению ЦИ в среднем в 2,39 и 2,0 раза (70,7 ± 3,39 и 60,4 ± 3,6;

$p \leq 0,01$), а в концентрации 10 мкг/мл – в 1,7 раза (49,1 ± 2,6; $p \leq 0,01$) по отношению к контролю.

Представленные нами результаты демонстрируют, что различные по химической структуре фукоиданы из бурых водорослей усиливают пролиферацию спленоцитов и киллерную активность НК-клеток, что способствует более детальному пониманию аспектов механизма их активационного действия на клетки-эффекторы врожденного иммунитета.

ВЛИЯНИЕ L-ФЕЛИНИНА НА РЕПРОДУКТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ДОМОВЫХ МЫШЕЙ

Маланьина Т.В., Вознесенская В.В.

Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН, Москва,
e-mail: vvoznenskaya@gmail.com

Химические сигналы млекопитающих являются обязательными элементами экосистем. Обогащение или обеднение окружающей среды подобными веществами может существенно влиять на темпы развития популяций, соотношение полов, выживаемость потомства. Межвидовая химическая коммуникация оказалась наименее исследованной областью, и, в особенности, такой важный аспект, как: обмен химической информацией в системе «хищник-жертва». Нашими исследованиями был показан эффект подавления размножения грызунов запахом хищника, а именно, редукция размеров выводка потенциальной жертвы [1], описаны гормональные механизмы, лежащие в его основе [2], показана роль вомероназального органа в реализации этих эффектов [3, 4]. Фелинин является уникальной аминокислотой, содержащей серу, обнаруженной в моче домашней кошки, а также представителей и некоторых других видов кошачьих [5]. Продукция L-фелинина имеет выраженный сезонный характер. У кастрированных животных продукция достоверно снижена по сравнению с интактными [6, 7]. В 2006 году было описано семейство генов [8], кодирующих рецепторы, которые экспрессируются в выстилке основной обонятельной системы млекопитающих (TAARs). Лигандами к этим рецепторам являются аминокислоты, содержащие серу, и амины. Фелинин и его производные являются идеальными кандидатами для выполнения функции лиганда к TAARs, с одной стороны. С другой стороны, фелинин может претендовать на роль алломона (кайромона) у домовых мышей. Целью нашей работы являлось исследование биологической активности уникальной аминокислоты L-фелинина в отношении подавления размножения домовых мышей. Были использованы три основных подхода: поведенческий, эндокринологический и иммуногистохимический. Репродуктивный успех оценивали путем подсчета общего количества потомства.

При этом оценивали: размер выводка, соотношение по полу, вес детенышей в разные периоды развития. L-фелинин (US Biologicals) в концентрации, сопоставимой с естественной в моче хищника (0,05%), был использован как потенциальный активный ингредиент. Пробы крови для анализа на содержание кортикостерона были отобраны немедленно после экспозиции фелинина. В качестве контроля к моче домашней кошки мы использовали мочу морской свинки и воду. В качестве позитивного контроля использовали помещение животных в открытое поле с ярким освещением и высоким шумовым фоном (зуммер). Измерение уровня кортикостерона в плазме крови мышей было выполнено с использованием гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА). Мы использовали готовые наборы реактивов (DRG, США). Долговременные воздействия L-фелинина на уровень глюкокортикоидов было оценено неинвазивным путем по содержанию специфических метаболитов в фекалиях. Локализация активированных нейронов в основной и дополнительной обонятельных луковицах, а также в рецепторной ткани вомероназального органа в ответ на стимуляцию фелинином была выполнена с помощью иммуногистохимических методов (c-fos) [10]. Экспозиция беременных самок мышей к фелинину в режиме 2 раза в неделю на протяжении беременности привела к достоверному ($p < 0,05$, $n = 32$) сокращению размеров выводка. В весенне-летний период размер выводка в контроле составил $10,25 \pm 2,36$ ($n = 8$), а в опыте – $6,25 \pm 4,8$ ($n = 8$). В осенне-зимний период размер выводка в контроле составил $6,00 \pm 2,19$ ($n = 8$), а в опыте – $3,63 \pm 2,02$ ($n = 8$). Таким образом, независимо от сезона, сокращение размеров выводка под воздействием фелинина составило около 40%. Количество самцов в выводках в экспериментальной группе было достоверно ($p < 0,001$) выше, чем в контрольной. Одним из возможных механизмов такого эффекта является хронически повышенный уровень кортикостерона в плазме крови мышей под воздействием запаха хищника. Так, в наших экспериментах уровень кортикостерона в плазме крови мышей после 15-минутной экспозиции мочи домашней кошки составил $681,25 \pm 43,16$ нг/мл ($n = 8$); при повторной экспозиции – $706,25 \pm 123,63$ нг/мл и после третьей экспозиции – $716,25 \pm 105,55$ нг/мл. В тоже время в контрольной группе (вода) эти показатели составили $92,75 \pm 45,55$ нг/мл ($n = 8$), $77,88 \pm 23,79$ и $84,25 \pm 17,70$ нг/мл. В качестве второго контроля мы использовали мочу нехищного животного – морской свинки. При первом предъявлении нового стимула отмечается резкий подъем кортикостерона по сравнению с контрольной группой (вода), но при повторных предъявлениях происходит постепенное

снижение уровня этого гормона. При многократных помещениях мышей в «открытое поле» мы также отмечали реакцию угасания ответа на стрессирующий стимул. Таким, образом, только в случае использования запаха домашней кошки мы не наблюдали привыкания на уровне гормонального ответа при повторных предъявлениях стимула, что отражает врожденный характер ответа. Экспозиция фелинина на протяжении двух недель вызвала долговременное достоверное повышение ($p < 0,05$) специфических метаболитов глюкокортикоидов в фекалиях. В контрольной группе мышей ($n = 13$) концентрация метаболитов в фекалиях составила $203,85 \pm 47,74$ нг/мг, а в экспериментальной – $702,15 \pm 122,24$ нг/мг. Таким образом, L-фелинин достаточно хорошо повторяет эффекты цельной мочи домашней кошки. Иммуногистохимические исследования позволили локализовать активацию, как в основной обонятельной луковице, так и в дополнительной. Данные результаты указывают на тот факт, что фелинин связывается, по крайней мере, с двумя типами рецепторов. Подводя итог всему вышеизложенному, можно сделать заключение, что L-фелинин и его производные являются сигнальными молекулами, участвующими в регуляции репродукции домашних мышей. Эффект долговременного повышения уровня глюкокортикоидов под влиянием фелинина можно использовать в лабораторных условиях как модель хронического стресса.

Исследования поддержаны РФФИ 10-04-01599 и МК – 709.2012.4

Список литературы

1. Voznessenskaya V.V., Naidenko S.V., Feoktistova N.Yu., Krivomazov G.J., Miller L., Clark L. Predator odors as reproductive inhibitors for Norway rats // *Rats, Mice and People: Rodent Biology and Management* / Ed. by Singleton G.R., Hinds L.A., Krebs C.J. – Canberra: ACIAR, 2003. – P. 131-136.
2. Voznessenskaya V.V., Naidenko S.V., Feoktistova N.Yu., Miller L., Clark L. Hormonal mechanisms of litter reductions in rodents under predator odor influence // *Chem. Senses.* – 2000. – Vol. 25. – P. 604-605.
3. Voznessenskaya V.V., Klyuchnikova M.A., Voznesenskaia A.E. The role of vomeronasal organ in mediating responses to predator odor // *Chem. Senses.* – 2007. – Vol. 32. – P. 33.
4. Voznessenskaya V.V., Voznesenskaia A. E., Klyuchnikova M. A. The role of vomeronasal organ in reception of predator scents // *Chem. Senses.* – 2006. – Vol. 31. – P. 43-44.
5. Hendriks W.H., Moughan P.J., Tarttelin M.F., Woolhouse A.D. Felinine: a urinary amino acid of Felidae // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1995. – Vol. 112B, №4. – P. 581-588.
6. Rutherford K.J., Rutherford S.M., Moughan P.J., Hendriks W.H. Isolation and characterization of a felinine-containing peptide from the blood of the domestic cat (*Felis catus*) // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, №1. – P. 114-119.
7. Miyazaki M., Yamashita T., Suzuki Y., Saito Y., Soeta S., Taira H., Suzuki A. A major urinary protein of the domestic cat regulates the production of felinine, a putative pheromone precursor // *Chem. Biol.* – 2006. – Vol. 13, №10. – P. 1071-1079.
8. Liberles S.D., Buck L.B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium // *Nature.* – 2006. – Vol. 442. – P. 645-650.
9. Voznessenskaya V.V., Klyuchnikova M.A., Wysocki C.J. Roles of the main olfactory and vomeronasal systems in detection of androstenone in inbred strains of mice // *Current Zool.* – 2010. – Vol. 56, № 6. – P. 813-818.

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ
ОБ ЭВОЛЮЦИИ КОНЕЧНОГО МОЗГА
ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ**¹Обухов Д.К., ¹Обухова Е.В., ²Пущина Е.В.¹Санкт-Петербургский государственный
университет;²Институт биологии моряим. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток,
e.mail: dkobukhov@yandex.ru

Конечный мозг (telencephalon) является важнейшей интегративной частью ЦНС позвоночных животных и человека. Именно этот отдел головного мозга достигает у приматов и человека максимального развития, обеспечивая развитие высших форм нервной деятельности (Андреева, Обухов, 1999; Nieuwenhuys et al., 2008). Важнейшим вопросом при изучении конечного мозга является вопрос о путях его эволюционного развития в разных группах позвоночных животных и соответственно вопрос о гомологии его отделов.

В 50-70-е годы XX века крупнейший отечественный нейрофизиолог-эволюционист, ученик и последователь идей Л.А. Орбели, — чл.-корр. РАН А.И. Карамян сформулировал «теорию теленцефализации или критических периодов в филогенезе ЦНС позвоночных» (Карамян, 1976). Было выделено пять этапов в развитии ЦНС, на каждом из которых происходило постепенное перемещение центров интеграции из низших отделов головного мозга (ствол, задний мозг) в высшие (средний, передний мозг). Этот процесс осуществлялся путем «надстройки» филогенетически молодых отделов ЦНС над «старыми» отделами мозга, которые теряли часть свойственных им ранее функций и систем связей. При этом развитие мозга происходило по пути перехода от диффузных, неспециализированных форм к специализированным формам структурной и функциональной организации. В определенные — «критические» (по определению А.И. Карамяна) — периоды развития позвоночных устанавливалась строгая корреляция между степенью специализации структур ЦНС и уровнем условно-рефлекторной деятельности. Конечному мозгу на ранних этапах его развития отводилась роль исключительно центра координации обонятельной информации, и только в последующие этапы эволюции конечный мозг приобретает главенствующее положение среди других отделов головного мозга, сосредоточив в себе высшие центры интеграции деятельности ЦНС и организма. Теория А.И. Карамяна внесла огромный вклад в понимание процессов эволюционного развития ЦНС.

Появление усовершенствованных методов исследования межнейронных связей, развитие нейроиммуногистохимии, расширение объектов исследования, внесли свои коррективы в пони-

мание этой проблемы. Оказалось, что в структурах конечного мозга, начиная от низших позвоночных, есть представительство всех основных сенсорных систем и имеется базовая система функциональных связей, которая сохраняется во всем ряду позвоночных, проходя только определенную реорганизацию и дифференциацию. Роль конечного мозга в этом процессе действительно прогрессивно возрастает путем дифференциации и совершенствования функциональных связей и повышения уровня переработки информации. Эти данные послужили основой создания еще одной теории эволюционного развития ЦНС — «теории парцелляции» (Ebbesson, 1984). В частности, было показано, что большинство систем связей, формирующихся в мозге в период эмбрионального развития, проходят стадию диффузных, недифференцированных проекций (при этом это характерно для низших позвоночных во взрослом состоянии). Затем происходит их дифференциация, становясь все более точными и специализированными (это характерно для большинства важнейших связей в ЦНС высших позвоночных и человека). Теория С. Эббессона также внесла свой вклад в понимание процессов развития ЦНС животных и человека, хотя критический разбор данных и аргументов, приводимых в пользу этой теории, появление новых фактов позволяют в настоящее время говорить, что не только процесс парцелляции определял ход развития ЦНС позвоночных животных. (Striedter, 2005).

На современном этапе развития эволюционной нейроморфологии основные акценты при изучении эволюции конечного мозга связаны с иммуногистохимическими исследованиями особенностей представительства основных нейромедиаторных систем в структурах мозга, а также с изучением экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, контролирующих процессы развития структур мозга. (Обухов, 2008; Medina, 2009; Nortcutt, 2008). Конечный мозг позвоночных имеет два основных типа строения: «инвертированный» — представленный парными полушариями с латеральными мозговыми желудочками и характерный для большинства групп современных позвоночных и «эвертированный», в полушариях которого отсутствуют латеральные мозговые желудочки, и встречающийся только у представителей лучеперых рыб (Actinopterygii) (Андреева, Обухов, 1999, Nortcutt, 2008). Несмотря на существенные различия в характере формирования и уровнях организации структур конечного мозга у представителей разных групп позвоночных, молекулярно-генетические исследования показали высокую степень гомологии этих структур. От рыб до млекопитающих развитие конечного мозга находится под контролем гена BF-1, нокаут-мутация по которому приводит к полному