

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.21+575.826+575.167

Особенности экспрессии маркерных генов рыжей полевки *Clethrionomys glareolus*, отражающие эффекты экотоксичности загрязненной диоксинами среды

А.Р. Лавренов^{1, 2, *} , Т.А. Мышлявкина^{1, 2}, Н.В. Умнова² ,
А.И. Ким^{1, 3} , В.С. Румак^{1, 2} 

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

²Центр безопасности биосистем, Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33;

³Биологический факультет, Университет МГУ–ППИ в Шэньчжэне, Китай, 518172, Провинция Гуандун, г. Шэньчжэнь, район Лунган, Даюньсиньчэн, ул. Гоцзидасюэюань, д. 1
*e-mail: overtaki@mail.ru

Оценить экотоксичность малых субтоксичных доз диоксинов без учета влияния на их свойства факторов реальных условий экспозиции обоснованно нельзя. Лучшим методическим приемом для этого является биомониторинг проявлений начальных токсических эффектов. Объектом исследования были рыжие полевки (*Clethrionomys glareolus*) из обитающей вблизи свалки природной популяции, а именно их значимо различимые по загрязнению тканей диоксинами группировки летнего и зимнего сезонов. Контролем служили полевки виварной линии. Начальные токсические эффекты характеризовали показателями экспрессии на уровне транскрипции генетических маркеров: *ahr*, *sup1a2*, *keap1*, *dnmt1*, *dnmt3a*, *dnmt3b*, *LINE-1* и *B1-SINE*. У полевок группировки летнего сезона уровни экспрессии генов *ahr*, *keap1*, *dnmt3a* и *dnmt3b* были значимо выше, чем в контроле. В группировке зимнего сезона против контроля была повышена экспрессия генов *sup1a2* и *keap1*, в отношении *dnmt1*, *LINE-1* и *SINE B1* отличий не выявлено. Зафиксированный у экспонированных диоксинами полевок рост экспрессии маркерных генов хорошо ассоциируется с механизмами формирования и развития токсического процесса в условиях действия диоксинов в малых дозах на несколько поколений популяции. Полученные данные будут способствовать созданию метода оценки при биомониторинге начальных эффектов экотоксичности загрязненной диоксинами среды.

Ключевые слова: биомониторинг, диоксины, маркерные гены, *ahr*, *sup1a2*, *dnmt*, рыжая полевка

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-6

В больших и малых городах России источники диоксинов (полихлорированных дибензо-п-диоксинов и дибензофуранов, ПХДД/Ф) встречаются повсеместно. К наиболее активным источникам относят полигоны твердых отходов производства и потребления, созданные по устаревшим технологиям или вообще без них, – свалки [1]. Обеспечение экологической безопасности на загрязняемых диоксинами территориях, в первую очередь в отношении человека, требует неперемного учета особенностей проявления присущих этим веществам свойств, определяемых длительным воздействием на организм млекопитающих малых доз, а также выраженным сверхкумулятивным эффектом. Заметим, что эти вещества могут проявлять токсические свойства при любых концентрациях, а установленные для них величины предельно допустимых концентраций (ПДК) характеризует условность [2]. Более того, на проявления этих свойств активно

влияют многие внешние, внутренние и временной факторы экспозиции [3]. Регистрация биологических ответов на уровне генетических и эпигенетических биомаркеров позволит учитывать эти особенности, что будет способствовать созданию условий для обоснованного выявления и характеристики эффектов (проявления обратимых по своей сути реакций на действия диоксинов) с учетом влияния на механизмы их формирования и развития различий в чувствительности/резистентности особей/индивидуумов в реальных условиях экспозиции [2]. Более того, регистрация таких ответов при биомониторинге создаст лучшие условия для обоснованного решения проблем в области обеспечения экологической безопасности, т.к. изменения на уровне органов и тканей следует ожидать при значимо больших мерах токсического воздействия [4].

В объектах окружающей среды диоксины присутствуют в виде сложных смесей (известно

210 совместно встречающихся соединений – конгенеров). Наиболее токсичным среди них общепризнан 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксин (ТХДД), обладающий очень высоким канцерогенным потенциалом для человека и животных. Многочисленные экспериментальные исследования токсичности конгенеров позволили выделить ТХДД в качестве эталона, относительно которого они оцениваются [2].

Важной особенностью токсического действия диоксинов на организм человека является их способность вызывать отсроченные эффекты, сходные с проявлениями полигенных заболеваний, а также влияние факторов и условий экспозиции на механизмы формирования таких эффектов [5].

Для оценки опасности диоксинов обоснованы санитарно-гигиенические нормативы, в том числе допустимого поступления в организм человека (по данным ВОЗ₍₁₉₉₈₎ 1–4 пг/г в перерасчете на ТХДД, в России – 10 пг/г) и загрязнения сред (почв, воздуха и т.д.). В последнем случае величины санитарно-гигиенических нормативов или ориентировочно безопасного уровня воздействия (ОБУВ) для России в большинстве случаев оказались значимо выше принятых в зарубежных странах. Например, отечественный ОБУВ для почв сельскохозяйственных угодий в России составил 5,0 нг/кг¹ против допустимых концентраций в почвах США – 0,1 нг/кг, в Германии – 1,0 нг/кг, в Нидерландах – 4,0 нг/кг [2]. Подобные различия отмечены относительно атмосферного воздуха (Россия – 0,5 пг/м³ – ГН-2.1.6.014-94; США – 0,02 пг/м³, Нидерланды – 0,24 пг/м³ [2]) и питьевой воды (Россия – 20 пг/л; приказ МЗ СССР №142-9/105 от 05.05.1991²; США – 0,013 пг/дм³). Между тем, эти нормативы далеко не в полной мере учитывают влияние факторов реальных условий экспозиции на проявления токсических свойств. Наилучшие условия для учета большинства факторов предоставляет биомониторинг с использованием млекопитающих. Перспективы применения мелких млекопитающих для выявления и характеристики ряда генетических процессов, происходящих в природных популяциях рыжих полевков, обитающих на загрязненных диоксинами территориях в окрестностях свалок, показаны нами ранее [6]. Этот начальный по своей

сути результат требовал последующей разработки путем расширения перечня генов-маркеров, показателей экспрессии/транскрипции, которые должны отражать эффекты экотоксичности загрязненной диоксинами среды.

Основой достижения поставленной цели стали современные представления о механизмах, участвующих в реакциях организма на действие ксенобиотиков. Прежде всего, речь идет о начальных механизмах влияния малых субтоксичных доз диоксинов на процессы, запускаемые этими веществами на генетическом и эпигенетическом уровнях. К ключевым проявлениям этого влияния относят экспрессию гена *ahr*, характеризующую активацию сигнальных путей прямого взаимодействия диоксинов с цитозольным белком – рецептором ароматических углеводов (AhR, диоксинный рецептор) с последующей активацией лигандированным рецепторным комплексом (AhR:диоксин) экспрессии генов первой и второй фаз биотрансформации ксенобиотиков, в первую очередь – *cyp1a2* [2, 7–9]; индукцию окислительного стресса при участии редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE [10]; изменения механизмов эпигенетической регуляции и поддержания стабильности генома. В качестве биомаркеров эпигенетических изменений и дестабилизации генома можно рассматривать изменения экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз *dnmt1*, *dnmt3a*, *dnmt3b* и транскрипции ретротранспозонов [11–13].

Без учета особенностей проявления этих эффектов трудно сформировать системные представления о возникающих в клетках изменениях, способствующих запуску механизмов формирования и развития токсического процесса в условиях длительного воздействия на организм диоксинов в малых дозах. Более того, отражающие эти изменения показатели могут быть адаптированы к решению задач в области биомониторинга эффектов экотоксичности загрязненной диоксинами среды.

Материалы и методы

Исследованы две выборки животных из природной популяции рыжей полевки (*Clethrionomys (Myodes) glareolus* Schreb 1780), обитающей на загрязненных диоксинами территориях. Концентрации в тканях составляли – WHO-TEQ₀₅ в среднем 2,1 (0,4–13,0) пг/г, сухого веса; ТХДД 0,2 (0,07–0,3) пг/г сухого веса [14]). Зоны отлова расположены в ≈ 1,5 км от границ санитарной зоны законсервированного полигона твердых бытовых отходов (ТБО) «Саларьево» (г. Москва). Обследованы выборки из различных по показателям загрязнения диоксинами функциональных группировок полевков зимнего и летнего сезонов. В ходе проводимых ранее исследований показано, что у представляющих функциональную группировку зимнего сезона животных концентрации диоксинов (WHO-TEQ₀₅) оказались меньше, чем у полевков летнего сезона –

¹ Гигиенический норматив ГН 2.1.7.3298-15 «Ориентировочные допустимые концентрации (ОДК) полихлорированных дибензо-п-диоксинов и дибензофуранов (в пересчете на 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-пара-диоксин и его аналоги) в почве населенных мест, сельскохозяйственных угодий и промышленной площадки» и Постановление Главного Государственного Санврача РФ от 28 января 2021 года № 2 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания».

² Приказ 142-9/105 О гигиеническом нормировании диоксинов в воде и продуктах питания. <https://www.normacs.ru/Doclist/doc/12LQU.html>

0,48±0,36 пг/г липидов против 4,01±4,67 пг/г липидов соответственно [15]. Выборка рыжих полевок из группировки зимнего сезона, отловленная в апреле 2021 г., обозначена как С1, из летнего сезона (отловлена в ноябре 2021 г.) – как С2.

Учитывая, что для этого вида не выведены линии животных с известными мутациями или характеристиками популяции, которые могут повлиять на результаты исследования, сделанный нами выбор в пользу рыжих полевок как модельного вида мы сочли вполне оправданным. Условно контрольными для исследованных выборок С1 и С2 стали выборки рыжих полевок из виварной линии, поддерживаемой в научно-экспериментальной базе «Черноголовка» Института проблем экологии и эволюции РАН (ИПЭЭ РАН), обозначенные соответственно Ч1 и Ч2. Виварная линия, происходящая от популяции диких особей из Тверской области, не подвергалась воздействию диоксинов [15]. Обследование всех выборок было выполнено одновременно.

При оценке физического состояния обследованных особей видимых патологий (опухоль, нарушения морфогенеза) отмечено не было. Все животные были сопоставимы по возрасту. Характеристика биоматериала представлена в табл. 1.

Таблица 1

Общая характеристика обследованного биоматериала

Регистрируемые параметры	Исследуемые выборки			
	Ч1	С1	Ч2	С2
Дата обследования, месяц/год	04/2021	04/2021	10/2021	10/2021
Размер выборки, <i>n</i>	10	12	7	13
Пол, самцы/самки	5 / 5	10 / 2	5 / 2	12 / 1
Масса тела, г	21,5 ± 2,7	24,1 ± 2,9	17,6 ± 2,2	15,8 ± 1,5
Длина тела, мм	97,1 ± 2,9	96,1 ± 3,8	101,1 ± 6,8	81,2 ± 2,4

Отлов и забой животных. Полевок отлавливали рядом с поселением Картмазово – на расстоянии 1,0–1,3 км от полигона ТБО «Саларьево». Место отлова – смешанный лес с преобладанием мелколиственных пород (береза, осина) и небольшим присутствием хвойных (сосна, ель), с развитым подлеском (орешник, малина), координаты – 55.615429, 37.401984.

Животных после отлова помещали в клетки и содержали в лаборатории в одинаковых условиях в течение 5–8 сут до забоя вместе с условно-контрольными животными. В условиях лаборатории полевок давали воду и стандартный корм. Таким образом частично исключали влияние стресса или возможных заболеваний животных.

Забой животных проводили методом цервикальной дислокации. Метод эвтаназии соответствовал требованиям ст. 6 и Приложения IV Директивы 2010/63/EU.

Выделение РНК и обратная транскрипция. Для сохранения РНК от каждой особи брали по фраг-

менту печени (главный орган метаболизма ксенобиотиков [16]) массой примерно 0,01–0,05 г, помещали его в раствор фиксатора IntactRNA («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями. Выделение РНК проводили с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия) по протоколу производителя. На спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США) определяли концентрацию РНК в пробе. 2 мкг РНК обрабатывали ДНКазой I в соответствии с протоколом фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) с использованием случайного декануклеотидного праймера.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Уровень экспрессии генов-маркеров и мобильных элементов оценивали методом количественной ОТ-ПЦР. Протокол ПЦР в реальном времени: 95° – 5 мин, затем 40 циклов (95° – 10 с, 55° – 30 с, 72° – 40 с). В работе использовали амплификатор Bio-Rad MJ MiniOpticon (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве референсного гена применили ген β-актина *actb*. Уровень экспрессии генов рассчитывали в соответствии со стандартным методом ΔCt. При статистической обработке результатов использовали критерий Манна-Уитни. Для оценки вариабельности применяли коэффициент осцилляции $p_{x\%}$.

Выбранные для исследования гены и использованные праймеры приведены в табл. 2. Средний диапазон длин ПЦР-продуктов составлял 150–170 п.н.

Результаты и обсуждение

Показатели экспрессии генов представлены на рисунке. При анализе диаграмм важно учитывать, что наши исследования выполнены на животных из двух функциональных группировок, т.е. фактически из сменяющих друг друга в течение года поколений локальной популяции, ткани которых содержали значимо различимые концентрации диоксинов [17]. Наличие этой разницы позволяет рассматривать регистрируемые эффекты экспрессии маркерных генов не только во взаимосвязи с реакциями организма на разных уровнях (генетическом и эпигенетическом), но и как отражающие последствия воздействия диоксинов и сопутствующих им ксенобиотиков на цикломорфных млекопитающих. Необходимость учета влияния на проявления этих реакций сезонных различий уже отмечена [18].

Функциональная группировка зимнего сезона. Статистически значимых отличий между показателями уровней экспрессии гена *ahr* у животных из выборки С1 против выборки Ч1 не выявлено (рисунок А). Между тем отмечена выраженная вариабельность этих показателей. Более того, у трех из 12 особей выборки С1 показатели экспрессии гена *ahr* оказались на уровне, превышающем верхнюю границу вариабельности его экспрессии в условно контрольной выборке Ч1.

Таблица 2

Список генов и праймеров, использованных в работе

Ген	Праймер	Последовательности финальных праймеров (направление от 5' к 3')
<i>actb</i>	Прямой	GAG CCA GAG CAG TGA TCT CC
	Обратный	GCT CTT TTC CAG CCT TCC TT
<i>ahr</i>	Прямой	GAA GAC CGA GCT GAG TTC CA
	Обратный	AGC CGG CAT ATG AAG CAC CT
<i>keap1</i>	Прямой	GGC GGA TGA TCA CAC CAA TGA A
	Обратный	ACT CCG TCG GTG CTT CAT GG
<i>cyp1a2</i>	Прямой	GAC CTC AGC TGC CCT ATC TG
	Обратный	ACA CAA AGG GGT CTT CCC AC
<i>dnmt1</i>	Прямой	AGT GAC GAG GAA GCT GTG GT
	Обратный	AAG GAA GTA GAA GCG GTC AGG
<i>dnmt3a</i>	Прямой	CCG GCT CTT CTT TGA GTT CTA C
	Обратный	AGA TGT CCC TCT TGT CAC TAA CG
<i>dnmt3b</i>	Прямой	GAT GGA GAC AGC ACT GAG TAC C
	Обратный	TGG CGC TTG GAG GTG GCT TT
<i>B1-SINE</i>	Прямой	ACG CCT TTA ATC CCA GCA CT
	Обратный	TTT CGA GAC AGG GTT TCT CTG
<i>LINE-1</i>	Прямой	CTC AGA AGA TGG AAA GAT CTC CCA
	Обратный	GAT GGG GAT TGC ATT GAA TCT GT

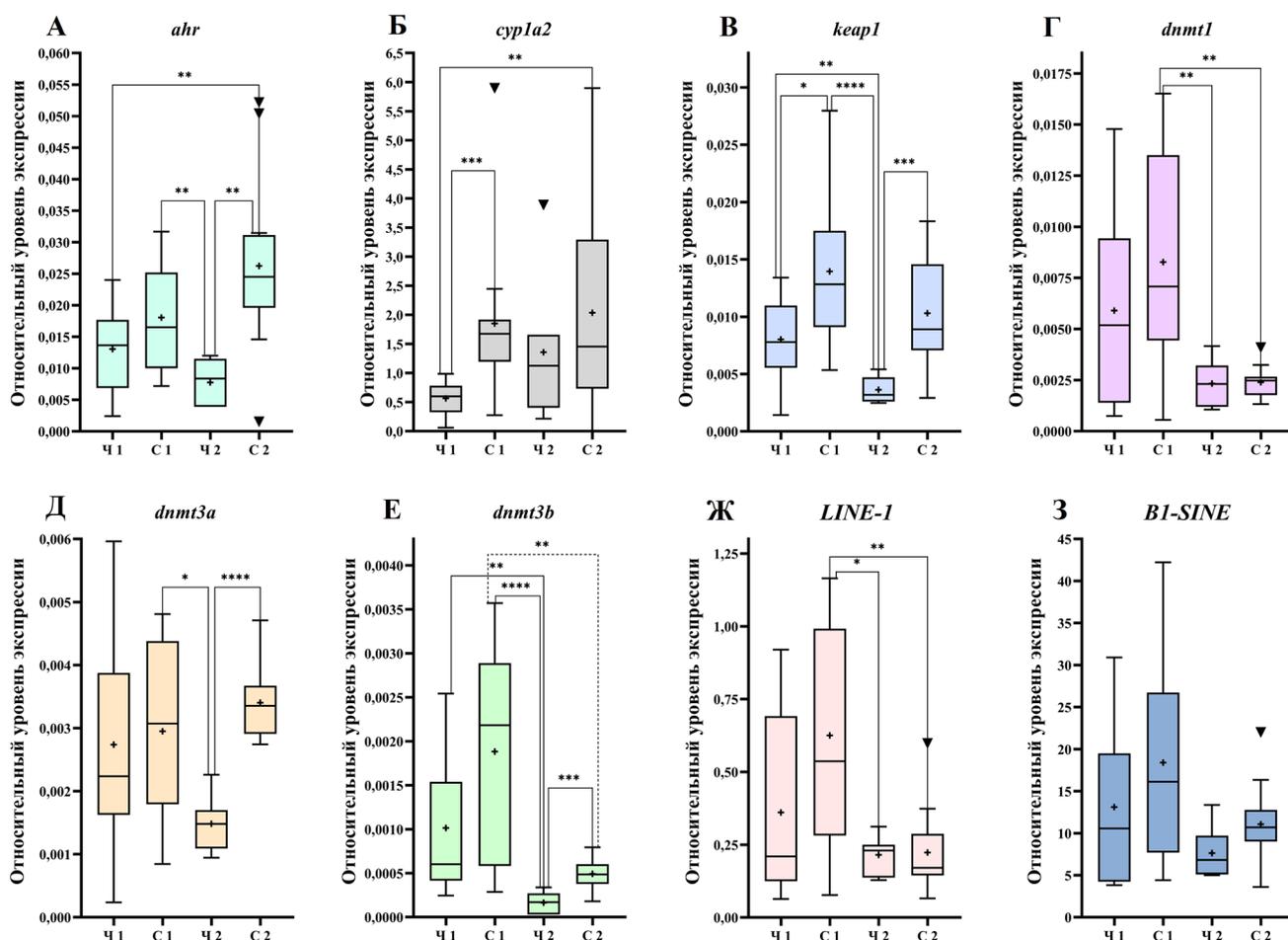


Рисунок. Сравнение относительных уровней экспрессии генов *ahr*, *cyp1a2*, *keap1*, *dnmt1*, *dnmt3a*, *dnmt3b*, *LINE-1* и *B1-SINE* у рыжих полевок с помощью критерия Манна-Уитни. Линия в середине ящика – медиана, границы ящика – первый и третий квартили, «усы» – размах, ▼ – выбросы, + – среднее; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$

Экспрессию *sup1a2* и *keap1* характеризовали существенно большие средние уровни в выборке С1 против выборки Ч1 (рисунок Б и В). При анализе этих различий важно учитывать, что основной механизм токсичности диоксинов определяет индукция гемсодержащих белков, в первую очередь – микросомальных ферментов [16, 19]. В роли признанных маркеров такой индукции выступают экспрессия *sup1a2* и последующие реакции биотрансформации, происходящие с образованием активных форм кислорода и, как следствие, развитием окислительного стресса [20]. Отмеченное в выборке С1 повышение уровня экспрессии *keap1*, обладающего повышенной чувствительностью к изменениям гомеостаза, можно рассматривать как еще одно свидетельство воздействия лигандированных (в том числе диоксинами) комплексов белков системы AhR на чувствительные элементы ДНК в промоторах множества генов, включая участников множественных механизмов последующей каскадной регуляции сигнальных путей [21].

Не установлено статистически значимых различий между выборками С1 и Ч1 по показателям, характеризующим эпигенетическую регуляцию – уровням экспрессии всех трех ДНК-метилтрансфераз (*dnmt1*, *dnmt3a*, *dnmt3b*) и транскрипции ретротранспозонов *B1-SINE* и *LINE-1* (рисунок Г, Д, Е, Ж, З).

Исходя из перечисленного выше, мы рассматриваем зарегистрированные нами изменения экспрессии генов как особенности проявления естественных ответных реакций генома рыжей полевки на действие загрязняющих веществ в экологически значимых малых дозах в осенне-зимних условиях экспозиции [2, 16].

Возможность ассоциации рассматриваемых нами поглощенных животными доз с экологически значимыми (малыми) определяется тем, что их количественные значения находятся в диапазоне типичных для жителей многих городов России нагрузок диоксинами [22–24], а также не превышают санитарно-гигиенические и экологические нормативы³.

Функциональная группировка летнего сезона.

У полевок С2 средние показатели уровня экспрессии генов *ahr*, *keap1*, *dnmt3a* и *dnmt3b* оказались значимо выше против зарегистрированных у полевок Ч2 (рисунок А, В, Д, Е). В отношении *sup1a2* и *dnmt1* отличий не выявлено (рисунок Б и Г). При анализе причин, определивших отсутствие различий в уровнях экспрессии *sup1a2* между этими выборками, мы обратили внимание на чрезвычайно высокую вариабельность зарегистрированных по-

казателей – значения коэффициента осцилляции в выборках С2 и Ч2 составляли 290% и 270% соответственно. При этом у большей части экспонированных полевок (у 9 особей из 13) показатели экспрессии *sup1a2* превышали медианные значения для условного контроля, а у 2 из 13 особей – максимальные для него значения.

К выявленным особенностям экспрессии генов *dnmt1*, *dnmt3a*, *dnmt3b* в рассматриваемых выборках можно отнести сравнительно небольшие уровни их вариабельности. При этом у особей из выборки С2 показатели экспрессии *dnmt3a* и *dnmt3b* оказались значимо выше тех, что отмечены у полевок из выборки Ч2. В отношении *dnmt1* значимых отличий не выявлено.

Ранее мы наблюдали [6] повышенный уровень экспрессии *dnmt1* у полевок, обитающих в условиях загрязнения. С одной стороны, этот факт можно рассматривать как противоречащий вновь полученным данным. Между тем, это может свидетельствовать лишь о неоднозначной направленности эффектов регуляции метилтрансферазами в разных условиях. Считается, что ДНК-метилтрансфераза *Dnmt1* задействована преимущественно в механизмах поддержания метилирования ДНК после репликации в свободных от действия стрессовых факторов условиях. В то же время при появлении стресса могут включаться процессы метилирования *de novo* с участием гена *dnmt3a* и кодируемой им ДНК-метилтрансферазы [25]. В связи с этим выявленный нами эффект значимых отличий экспрессии гена *dnmt3a* в выборке С2 против выборки Ч2 дает основание рассматривать его как проявление вероятной специфической активации ДНК-метилтрансфераз *Dnmt3a* и *Dnmt3b* для поддержания гомеостаза и стабильности генома в период жесткой экспозиции, а именно в летний сезон года. Согласованную работу генов *dnmt1* и *dnmt3a* исследователи уже отмечали [26, 27] как при метилировании *de novo*, так и при поддержании стабильного уровня метилирования [26].

Показатели активности ретротранспозонов *LINE-1* и *SINE B1* между выборками С2 и Ч2 не различались (рисунок Ж, З). Не исключено, что это не случайно, особенно на фоне повышенных уровней транскрипции двух генов ДНК-метилтрансфераз (*dnmt3a* и *dnmt3b*). Важно отметить, что наибольшее число потенциально метилируемых/деметилируемых сайтов CpG локализовано в ретротранспозонах и tandemных повторах ДНК. Известно, что в условиях постоянного химического стресса активность ретротранспозонов может возрастать с последующим приростом частоты спонтанного мутагенеза. Вполне вероятно, что основным механизмом формирования адаптации к загрязненной диоксинами территории стала повышенная экспрессия генов *dnmt3a* и *dnmt3b*, позволившая обеспечить защиту генома путем активной репрессии ретротранспозонов.

³ Гигиенический норматив ГН 2.1.7.3298-15; Руководство по оценке риска для населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Руководство. Р2.1.10.1920-04 (утверждено Главным государственным санитарным врачом РФ 05.03.2004).

Таким образом, использованные в работе показатели экспрессии генов и активности ретротранспозонов отражают эффекты начальных ответных реакций организма на действие факторов среды обитания в условиях длительного хронического воздействия диоксинов, загрязняющих среду в малых концентрациях. В этой связи отметим, что при изучении проявлений этих эффектов во взаимосвязи с мерами токсической нагрузки диоксинов на организм важно учитывать вероятность нелинейного характера таких взаимосвязей, когда низкие их дозы могут быть более активны в отношении вызываемых эффектов (парадоксальное действие диоксинов с нелинейными (U-образными) кривыми зависимости «доза – эффект») [3, 28–30]. Более того, следует учитывать множественные сигнальные пути и механизмы с участием AhR, вовлекаемые в ответные реакции на низкие дозы с самых ранних этапов онтогенеза и способные изменять функциональную активность иммунной, нервной, репродуктивной и других систем организма. Однако без учета относительного уровня экспрессии гена *ahr* будет трудно интерпретировать остальные показатели.

Систематизация полученных данных позволяет выделить три взаимосвязанные между собой группы маркеров рассматриваемых эффектов. К первой группе мы можем отнести показатели активности гена *ahr* и гена *cyp1a2*, которые считаются признанными маркерами воздействия на микросомальную систему [19]. Регистрация активности *keap1* способствует диагностике индукции окислительного стресса, вызываемого целым каскадом реакций с участием продуктов биотрансформации эндогенных и экзогенных соединений [10, 31]. Вероятность изменения эпигенетических событий и возможных последствий для процессов адаптации в целом может быть зарегистрирована с помощью маркеров транскрипционной активности ретротранспозонов на фоне модифицированной экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз [27, 32].

Проявления экспрессии маркерных генов в разные сезоны года. Особенностью нашего эксперимента является учет влияния сезонных факторов на проявления зарегистрированных эффектов экспрессии маркерных генов у особей из природной популяции рыжих полевок, что согласуется с синхронизирующей ролью среды [18, 33–36].

У животных условно контрольных выборок Ч1 и Ч2 средние уровни экспрессии *ahr*, *cyp1a2*, *dnmt1* и *dnmt3a* были неразличимы. Средние уровни экспрессии *keap1* и *dnmt3b* оказались значимо выше в выборке зимнего сезона. К свидетельствам адаптационного характера этого возрастания активности можно отнести выраженную вариабельность показателей экспрессии генов *dnmt1*, *dnmt3a* и *dnmt3b* в выборке зимнего сезона, при участии которых генотип организма взаимодействует с окружающей средой [25, 37, 38]. При этом уве-

личение уровня экспрессии молекулярного сенсора окислительного стресса (*keap1*) мы сочли допустимым рассматривать в аспекте появления более широкого спектра естественных стрессовых факторов в зимний период года [10].

Показатели экспрессии маркерных генов *dnmt1*, *dnmt3b* и *LINE-1* у полевок из выборки С1 оказались значимо ниже, чем в выборке С2 (рисунок Г, Е, З). Для *ahr*, *cyp1a2*, *keap1*, *dnmt3a* и *B1-SINE* значимых отличий не найдено (рисунок А, Б, В, Д, Ж). Выявленные различия в уровне экспрессии *dnmt1*, *dnmt3b* и *LINE-1* в полной мере укладываются в современные представления о роли эпигенетического репрограммирования в процессах адаптации к стрессовым факторам среды обитания, в данном случае – к факторам зимнего сезона [37, 38].

Полученные данные свидетельствуют о том, что выбранный нами набор генов и анализируемые показатели их экспрессии позволяют создать научно обоснованные представления о запускаемых в организме рыжих полевок процессах в ответ на длительное воздействие на локальную популяцию диоксинов, загрязняющих среду за пределами санитарной зоны свалки в малых дозах. Стоит отметить, что наблюдаемые нами на молекулярном уровне эффекты способны приводить как к адаптационным изменениям, так и к негативным последствиям для здоровья. Эпигенетические модификации, включая особенности метилирования ДНК, возникающие на ранних этапах онтогенеза и передаваемые в ряду поколений, рассматривают как важный компонент патогенеза многофакторных и экологозависимых заболеваний, а также как участника вероятных механизмов адаптации к действию экотоксикантов [39–42]. Баланс между надежностью и гибкостью ответов систем адаптации к разным стрессовым ситуациям может поддерживаться и за счет системы диоксинового рецептора, основной белок которой (AhR) сейчас рассматривают как универсальный фактор, считывающий метильные метки в чувствительных элементах генов – мишеней ксенобиотиков [43]. Последующее формирование методической базы для изучения и оценки экотоксичности загрязненной диоксинами среды требует расширения работ. Прежде всего это относится к учету влияния синхронизирующей роли сезонных, возрастных и других факторов натурального эксперимента (с использованием выбранных нами показателей).

Авторы выражают благодарность научному сотруднику Лаборатории поведения и поведенческой экологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН) кандидату биологических наук Осиповой Ольге Валентиновне за предоставление животных из коллекции животных

и оборудования ЦКП «Живая коллекция диких видов млекопитающих» научно-экспериментальной базы «Черноголовка» ИПЭЭ РАН.

Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования. Работы выполнены в рамках плановой тематики

и бюджетного финансирования МГУ и ИПЭЭ РАН. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены комиссией ИПЭЭ РАН по биоэтике (протокол № 68). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розанов В.Н., Трегер Ю.А. Оценка выбросов диоксинов основных источников в РФ. *Экол. пром. Росси.* 2011;(2):32–35.
2. Софронов Г.А., Рембовский В.Р., Радилев А.С., Могиленкова Л.А. Современные взгляды на механизм токсического действия диоксинов и их санитарно-гигиеническое нормирование. *Мед. академ. журн.* 2019;19(1):17–28.
3. Румак В.С., Умнова Н.В. Диоксины и безопасность биосистем: результаты натуральных исследований. *Жизнь Земли.* 2018;40(3):308–324.
4. Безель В.С. Основы экологической токсикологии. *Общая токсикология.* Под ред. Б.А. Курляндского и В.А. Филова. М.: Медицина; 2002:545–586.
5. Баранов В.С., Баранова Е.В. Геном человека, эпигенетика многофакторных болезней и персонализированная медицина. *Биосфера.* 2012;4(1):76–85.
6. Лавренов А.Р., Орджоникидзе К.Г., Румак В.С., Ким А.И., Умнова Н.В. Оценка начальных проявлений токсического процесса в условиях хронического действия малых субтоксичных доз диоксинов, загрязняющих среду. *Экол. чел.* 2022;(3):54–63.
7. Kwon Y.-J., Shin S., Chun Y.-J. Biological roles of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1 enzymes. *Arch. Pharm. Res.* 2021;44(1):63–83.
8. Larigot L., Juricek L., Dairou J., Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open.* 2018;7:1–9.
9. Quattrochi L.C., Vu T., Tukey R.H. The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene. A region of DNA that supports AH-receptor binding and promoter-specific induction. *J. Biol. Chem.* 1994;269(9):6949–6954.
10. Turpaev K.T. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry (Mosc.).* 2013;78(2):111–126.
11. Akemann C., Meyer D.N., Gurdziel K., Baker T.R. Developmental dioxin exposure alters the methylome of adult male zebrafish gonads. *Front. Genet.* 2019;9:719.
12. Aluru N., Kuo E., Helfrich L.W., Karchner S.I., Linney E.A., Pais J.E., Franks D.G. Developmental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters DNA methyltransferase (*dnmt*) expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2015;284(2):142–151.
13. Zhang Y., Liu C., Cheng H., Tian S., Liu Y., Wang S., Zhang H., Saqib M., Wei H., Wei Z. DNA methylation and its effects on gene expression during primary to secondary growth in poplar stems. *BMC Genomics.* 2020;21(1):498.
14. Румак В.С., Умнова Н.В. Биомониторинг состояния загрязненной диоксинами среды в окрестностях свалки: к минимизации риска для здоровья населения. *Хим. безопасн.* 2020;4(2):68–79.
15. Roumak V.S., Popov V.S., Shelepchikov A.A., Osipova O.V., Umnova N.V. Seasonal peculiarities of PCDD/Fs levels in bank voles inhabiting sites in the vicinity of the landfill with municipal wastes (Moscow, Russia). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022;29(35):52796–52805.
16. *A textbook of modern toxicology.* 4th ed. Ed. E. Hodgson. Hoboken: John Wiley & Sons; 2010. 648 pp.
17. Roumak V.S., Levenkova E.S., Umnova N.V., Popov V.S., Turbabin A.A., Shelepchikov A.A. The content of dioxins and furans in soils, bottom sediments of water bodies, and tissues of small mammals near the landfill site with municipal solid wastes (Moscow, Russia). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018;25(29):29379–29386.
18. Оленев Г.В., Григоркина Е.Б. Функциональные закономерности жизнедеятельности популяций грызунов в зимний период. *Экология.* 2014;(6):428–428.
19. Куценко С.А. *Основы токсикологии.* СПб.: Воен.-мед. академ. им. С.М. Кирова; 2002. 395 с.
20. Stading R., Chu C., Couroucli X., Lingappan K., Moorthy V. Molecular role of cytochrome P4501A enzymes in oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* 2020;20:21:77–84.
21. Puga A., Ma C., Marlowe J.L. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 2009;77(4):713–722.
22. Алексеев В.Б., Зайцева Н.В., Устинова О.Ю., Клейн С.В. Оценка диоксиновой нагрузки биосред быстро и медленного обмена у населения промышленно развитого региона. *Вестн. Перм. ун-та. Сер. Биол.* 2009;(10):180–182.
23. Ревич Б.А., Сотсков Ю.П., Клюев Н.А., Бродский Е.С., Липченко Ю.Н., Музуров И.В., Зейлерт В.Ю. Диоксины в окружающей среде, в крови и грудном молоке жителей города Чапаевска. *Гиг. санитар.* 2001;(6):6–11.
24. Амирова З.К., Шахтамиров И.Я. Содержание ПХДД/ф и ПХБ-ВОЗ в плазме крови и грудном молоке жителей Чеченской республики. *Юг России: экол. разв.* 2012;(2):125–129.
25. Maekawa F., Shimba S., Takumi S., Sano T., Suzuki T., Bao J., Ohwada M., Ehara T., Ogawa Y., Nohara K. Diurnal expression of *Dnmt3b* mRNA in mouse liver is regulated by feeding and hepatic clockwork. *Epigenetics.* 2012;7(9):1046–1056.
26. Fatemi M., Hermann A., Gowher H., Jeltsch A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur. J. Biochem.* 2002;269(20):4981–4984.
27. Haggerty C., Kretzmer H., Riemenschneider C., Kumar A.S., Mattei A.L., Bailly N., Gottfreund J., Giesselmann P., Weigert R., Brändl B. Dnmt1 has *de novo* activity targeted to transposable elements. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021;28(7):594–603.
28. Andersen M.E., Barton H.A. The use of biochemical and molecular parameters to estimate dose-

response relationships at low levels of exposure. *Environ. Health Perspect.* 1998;106(Suppl. 1):349–355.

29. Vandenberg L.N., Rayasam S.D., Axelrad D.A., Bennett D.H., Brown P., Carignan C.C., Chartres N., Diamond M.L., Joglekar R., Shamasunder B. Addressing systemic problems with exposure assessments to protect the public's health. *Environ. Health.* 2023;21(Suppl. 1):121.

30. Andersen M.E., Conolly R.B. Mechanistic modeling of rodent liver tumor promotion at low levels of exposure: an example related to dose-response relationships for 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Hum. Exp. Toxicol.* 1998;17(12):683–690.

31. Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* 2018;1865(5):721–733.

32. Min B., Park J.S., Jeong Y.S., Jeon K., Kang Y.-K. Dnmt1 binds and represses genomic retroelements via DNA methylation in mouse early embryos. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(15):8431–8444.

33. Astiz M., Heyde I., Oster H. Mechanisms of communication in the mammalian circadian timing system. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(2):343.

34. Weger B.D., Gobet C., David F.P., Atger F., Martin E., Phillips N.E., Charpagne A., Weger M., Naef F., Gachon F. Systematic analysis of differential rhythmic liver gene expression mediated by the circadian clock and feeding rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021;118(3):e2015803118.

35. Atger F., Gobet C., Marquis J., Martin E., Wang J., Weger B., Lefebvre G., Descombes P., Naef F., Gachon F. Circadian and feeding rhythms differentially affect rhythmic

mRNA transcription and translation in mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112(47):E6579–E6588.

36. Tischkau S.A. Mechanisms of circadian clock interactions with aryl hydrocarbon receptor signaling. *Eur. J. Neurosci.* 2020;51(1):379–395.

37. Паткин П.Е., Квинн Д. Эпигенетические механизмы предрасположенности к комплексным патологиям человека. *Экол. генет.* 2010;8(4):44–56.

38. Ferguson S.A., Maier K.L. A review of seasonal/circannual effects of laboratory rodent behavior. *Physiol. Behav.* 2013;119:130–136.

39. Liu R., Zacharewski T.R., Conolly R.B., Zhang Q. A physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling framework for mixtures of dioxin-like compounds. *Toxics.* 2022;10(11):700.

40. Паткин Е.Л., Софронов Г.А. Эпигенетика популяций, экотоксикогенетика и болезни человека. *Экол. генет.* 2012;10(4):14–28.

41. Chapelle V., Silvestre F. Population epigenetics: The extent of DNA methylation variation in wild animal populations. *Epigenomes.* 2022;6(4):31.

42. Casacuberta E., González J. The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Mol. Ecol.* 2013;22(6):1503–1517.

43. Habano W., Miura T., Terashima J., Ozawa S. Aryl hydrocarbon receptor as a DNA methylation reader in the stress response pathway. *Toxicology.* 2022;470:153154.

Поступила в редакцию 13.03.2023

После доработки 07.05.2023

Принята в печать 22.05.2023

RESEARCH ARTICLE

Peculiarity of marker genes' expression in bank voles *Clethrionomys glareolus* characterizing ecotoxicity effects of the territory contaminated with dioxins

A.R. Lavrenov^{1, 2, *} , T.A. Myshliavkina^{1, 2}, N.V. Umnova² ,
A.I. Kim^{1, 3} , V.S. Roumak^{1, 2} 

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

²A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, 33 Leninsky Prospect, Moscow, 119071, Russia;

³Shenzhen MSU–BIT university, International University Park Road, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, Guangdong Province, P.R., 518172, China

*e-mail: overtaki@mail.ru

To assess the ecotoxicity of low doses of dioxins is almost impossible without considering the influence of real exposure conditions on these substances' properties. The best approach to take these into account is the biomonitoring of the initial toxic effects' manifestation. We studied bank voles from population naturally exposed to dioxins, the summer-born adults and overwintered functional groups of animals differed by dioxin body burden. Dioxin-free samples of a vivarium bank voles' line served as a control. Initial effects of ecotoxicity were characterized by transcriptional levels of genetic markers: *ahr*, *cyp1a2*, *keap1*, *dnmt1*, *dnmt3a*, *dnmt3b*, *LINE-1* and *B1-SINE*. Summer-born functional group had significantly higher expression levels of *ahr*, *keap1*, *dnmt3a* and *dnmt3b* genes versus their control group. Overwintered functional group had elevated expression levels of *cyp1a2* and *keap1*, but no changes were found versus controls for

dnmt1, *LINE-1* and *SINE B1*. The increased expression of marker genes in dioxin-exposed voles was quite well associated with toxic process' mechanisms – their formation and progression under exposure of several generations to low sub-toxic doses. The data obtained will contribute to the development of a biomonitoring method for assessing the initial effects of dioxin ecotoxicity.

Keywords: *biomonitoring, dioxin, marker genes, ahr, cyp1a2, dnmt, bank voles*

Funding: This study was not supported by any external sources of funding.

Сведения об авторах

Лавренов Антон Русланович – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ, вед. инженер лаборатории центра безопасности биосистем ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-495-939-59-43; e-mail: overtaki@mail.ru; ORCID: 0000-0002-7318-8046

Мышлявкина Татьяна Алексеевна – аспирант кафедры генетики биологического факультета МГУ, ст. инженер лаборатории центра безопасности биосистем ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-495-939-59-43; e-mail: nics.cph@mail.ru

Умнова Наталия Владимировна – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. Центр безопасности биосистем ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-499-135-21-43; e-mail: unv2014@mail.ru; ORCID: 0000-0002-1615-2194

Ким Александр Иннокентьевич – докт. биол. наук, проф. кафедры генетики биологического факультета МГУ, проф. биологического факультета Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне. Тел.: 8-495-939-59-43; e-mail: aikim57@mail.ru; ORCID: 0000-0003-0398-8694

Румак Владимир Степанович – докт. мед. наук, проф., Руководитель центра безопасности биосистем, вед. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ, гл. науч. сотр. лаб. Центр безопасности биосистем ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-495-939-28-03; e-mail: roumak@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6645-8677