

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

№ 4 • 2016 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Эволюционная биология

- Марков А.В., Ивницкий С.Б. Эволюционная роль фенотипической пластичности. 3

Геронтология

- Анисимов В.Н., Жаринов Г.М. Средний возраст смерти и долгожительство мужчин-учёных различных специальностей 12
- Забуга О.Г., Вайсерман А.М. Трансгенерационное наследование продолжительности жизни: теоретические предпосылки и эмпирические доказательства . . . 19
- Моргунова Г.В., Клебанов А.А., Хохлов А.Н. Некоторые замечания, касающиеся взаимосвязи аутофагии, клеточного старения и ограничения клеточной пролиферации 28

Методы

- Котлярова М.С., Жуйков В.А., Чудинова Ю.В., Хайдапова Д.Д., Мойсенович А.М., Коньков А.С., Сафонова Л.А., Боброва М.М., Архипова А.Ю., Гончаренко А.В., Шайтан К.В. Индукция остеогенной дифференцировки остеобластоподобных клеток MG-63 при культивировании в трёхмерных условиях на фиброиновых микроносителях 34

Микология и альгология

- Бубнова Е.Н. Новые для Белого моря виды морских грибов 41
- Чемерис О.В., Рашевский В.В., Галкова К.А., Бойко М.И. Штаммовая изменчивость синтеза специфических молокосвёртывающих протеиназ у базидиального гриба *Irpex lacteus* 45

Микробиология

- Зарубина А.П., Перфильев Ю.Д., Сорокина Е.В., Нетрусов А.И. Оценка свойств феррата калия, используемого для очистки воды методом бактериального биотестирования 50

Молекулярная биология

- Александров О.С., Евтухов А.В., Киселёв И.И., Карлов Г.И. Молекулярно-генетические особенности нетранскрибируемого спейсера 5S-рДНК у *Hipporhae rhamnoides* L. 57
- Гросс С., Котова Е.Ю., Малюченко Н.В., Паскаль Дж.М., Студитский В.М. Поиск мишеней для госсипола в составе белка PARP1 61

Физиология

- Куликов О.И., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Орлова В.С., Иноземцев А.Н. Карнозин предотвращает развитие окислительного стресса в условиях токсического действия кадмия 66
- Рудницкая Е.А., Колосова Н.Г., Стефанова Н.А. Нейротрофическое обеспечение головного мозга в онтогенезе и при развитии нейродегенеративных заболеваний. 72
- Станкова Е.П., Мышкин И.Ю. О связи индивидуальных характеристик электроэнцефалограммы с уровнем интеллекта 83

CONTENTS

Evolutionary biology

- Markov A.V., Ivnitsky S.B. Evolutionary role of phenotypic plasticity 3

Gerontology

- Anisimov V.N., Zharinov G.M. Mean age of death and longevity of male scholars of different specialties. 12
- Zabuga O.G., Vaiserman A.M. Transgenerational inheritance of longevity: theoretical framework and empirical evidence. 19
- Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction. 28

Methods

- Kotliarova M.S., Zhuikov V.A., Chudinova Y.V., Khaidapova D.D., Moiseyevich A.M., Kon'kov A.S., Safonova L.A., Bobrova M.M., Arkhipova A.Y., Goncharenko A.V., Shaitan K.V. Induction of osteogenic differentiation of osteoblast-like cells MG-63 during 3D cultivation on fibroin microcarriers 34

Micology and Algology

- Bubnova E.N. Two marine fungi new for the White Sea 41
- Chemerys O.V., Rashevskiy V.V., Galkova K.A., Boyko M.I. Variability of strains of basidiomycetes *Irpex lacteus* to synthesis of specific milk-clotting proteinases. . . 45

Microbiology

- Zarubina A.P., Perfiliev Y.D., Sorokina E.V., Netrusov A.I. Evaluation of properties ferrate potassium as reagent water purification using the method bacterial bioluminescence testing 50

Molecular biology

- Alexandrov O.S., Evtukhov A.V., Kiselev I.I., Karlov G.I. Molecular genetic features of 5S rDNA non-transcribed spacer in *Hippophae rhamnoides* L. 57
- Gross S., Kotova E.Yu., Maluchenko N.V., Pascal J.M., Studitsky V.M. Evaluating PARP1 domains as gossypol targets. 61

Physiology

- Kulikova O.I., Fedorova T.N., Stvolinsky S.L., Orlova V.S., Inozemtsev A.N. Carnosine prevents the development of oxidative stress in the conditions of toxic action of cadmium. 66
- Rudnitskaya E.A., Kolosova N.G., Stefanova N.A. Brain neurotrophic supplementation in ontogenesis and during development of neurodegenerative diseases . . 72
- Stankova E.P., Myshkin I.Y. Association between individual EEG characteristics and level of intelligence. 83

ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 575.8:575.21:575.23

ЭВОЛЮЦИОННАЯ РОЛЬ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

А.В. Марков^{1,2}, С.Б. Ивницкий^{1,*}

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

² Палеонтологический институт имени А.А.Борисяка РАН;
Россия, 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная ул., д. 123

*e-mail: ivnitsky@mail.ru

Фенотипическая пластичность (способность одного генотипа производить разные фенотипы в зависимости от условий) играет в эволюции важную, но до сих пор слабо изученную и часто недооцениваемую роль. Как адаптивная, так и неадаптивная фенотипическая пластичность влияет на силу и направленность отбора, действующего на популяцию, и может, в зависимости от ситуации, ускорять или замедлять адаптивную эволюцию, дивергенцию и видообразование. Фенотипическая пластичность также влияет на направленность эволюции, причем направление пластических и эволюционных изменений может совпадать (генетическая ассимиляция), а может быть противоположным (генетическая компенсация). Особой формой фенотипической пластичности являются изменения фенотипа организма-хозяина, обусловленные изменениями симбиотической микробиоты. В обзоре рассмотрены основные формы фенотипической пластичности и современные данные об их влиянии на направленность и скорость эволюции. Особое внимание уделено новым экспериментальным данным, включая результаты, полученные в ходе долгосрочного эволюционного эксперимента на *Drosophila melanogaster*, проводимого на кафедре биологической эволюции биологического факультета МГУ.

Ключевые слова: фенотипическая пластичность, модификационная изменчивость, эволюция, адаптация, дивергенция, генетическая ассимиляция, экспериментальная эволюция, обзор.

Фенотипической пластичностью (ФП) называют способность одного и того же генотипа производить разные фенотипы в зависимости от условий среды. ФП в той или иной мере подвержены практически все признаки, поскольку фенотип в целом и все его компоненты развиваются в ходе онтогенеза в результате сложного взаимодействия генетических и средовых факторов [1], а также “онтогенетического шума” [2].

Важная эволюционная роль ФП подчеркивалась ранними эволюционистами [3–5], однако в дальнейшем она часто недооценивалась. Поскольку фенотипические изменения, вызываемые средой, не сказываются непосредственно на передаваемых потомкам генах и не могут быть напрямую “вписаны” в геном, теоретические работы и учебники по эволюции нередко не уделяли ФП должного внимания [1]. В последнее время среди эволюционистов наметилось возрождение интереса к ФП [1, 6–9], в том числе в рамках новой дисциплины — экологической биологии развития (эко-дево), изучающей влияние среды на онтогенез [10–11].

Экспериментальное изучение эволюции — быстро развивающееся направление, способное пролить свет на многие спорные вопросы, включая эволюционную роль ФП [12]. Однако экспериментально подтвержденных случаев влияния ФП на скорость

и направленность эволюции до сих пор известно немного. В данном обзоре мы рассмотрим основные формы ФП, которые можно классифицировать по их влиянию на приспособленность и общий уровень фенотипической изменчивости, и обсудим их эволюционную роль, уделяя особое внимание новым экспериментальным данным.

1. Отбор и ФП

Естественный отбор является главным фактором, определяющим эволюцию популяций и видов. Под его воздействием меняется генный состав популяций, что является ключевым моментом эволюционных изменений. Эти представления были детально разработаны еще в рамках классической синтетической (или генетической) теории эволюции (СТЭ), сложившейся к середине XX века в результате синтеза генетики и дарвинизма. В простейших эволюционно-генетических моделях отбор непосредственно воздействует на гены, изменяя их частоты в популяции. Однако следует учитывать, что в действительности фенотип развивается в результате сложного взаимодействия генов и среды, а оценка отбором генотипов обычно происходит в ходе взаимодействия особей, т.е. отбор или элиминация генов определяется взаимодействием фенотипов. Простейшие модели применимы лишь

тогда, когда проявление признаков, т.е. фенотип, задается исключительно генотипом, а внешняя среда и онтогенез не сказываются на их изменчивости. Этому требованию удовлетворяют лишь так называемые “менделевские” признаки, для которых характерно практически однозначное соответствие между генотипом и фенотипом. В природе такие признаки встречаются крайне редко. В подавляющем большинстве случаев на проявление признака помимо генотипа влияет внешняя среда и особенности онтогенеза.

Их строгое соотношение описывается в основной модели генетики количественных признаков, которая предполагает, что конкретное выражение (значение) признака особи задается ее генотипом, но при этом воздействие негенетических факторов, влияющих на ход онтогенеза, смещает это значение. Таких факторов, как внешних, так и собственно онтогенетических, может быть множество, и тогда вклад каждого из них оказывается случайным и незначительным. В результате распределение фенотипов при заданном генотипе должно иметь вид нормального распределения с определенной дисперсией [13]. Эта дисперсия и будет являться мерой ФП, поскольку отражает степень отклонения фенотипа при заданном генотипе.

Из генетики количественных признаков также известно, что величина ответа на отбор, т.е. селекционный сдвиг, определяется отношением аддитивной генетической изменчивости к негенетической изменчивости. Последняя, по существу, и может рассматриваться в качестве меры ФП. Если ФП по данному признаку отсутствует, то отбор непосредственно воздействует на генотипы, и селекционный сдвиг будет большим. Этому условию соответствуют упомянутые выше “менделевские” признаки. Но в большинстве случаев на проявление признака оказывают влияние как генетические, так и негенетические факторы, поэтому в популяции наблюдается как генетическая, так и негенетическая изменчивость (ФП). В результате в общем случае ФП уменьшает ответ на отбор, причем независимо от направления действия его вектора.

Приведенная выше модель предполагает одно важное допущение: негенетические факторы, воздействующие на признак, подчиняются нормальному распределению. В результате сильные отклонения признака при заданном генотипе встречаются значительно реже, чем малые отклонения, а направления отклонений симметричны относительно среднего значения, которое задает генотип особи. По этой причине суммарно сила воздействия факторов, увеличивающих значение признака, должна быть равной силе воздействия факторов, уменьшающих его значение. Модель также подразумевает, что у особей с разными генотипами должны быть одинаковые отклонения при одинаковом воздействии на их онтогенез внешних факторов, т.е. у них должна быть одинаковая ФП.

В реальных популяциях наблюдаются существенные отклонения от данного общего случая. Во-первых, разные генотипы могут по-разному реагировать на внешние воздействия, т.е. разные генотипы обладают разной ФП. Во-вторых, характер воздействия негенетических факторов может не подчиняться нормальному распределению. Например, популяция может занимать две или более сильно различающиеся экологические ниши, а ниши с промежуточными условиями могут отсутствовать. В результате распределение признаков у особей при заданном генотипе может приближаться к дискретному, а не нормальному типу, поскольку на формирование признака будут воздействовать только сильно различающиеся дискретные факторы внешней среды. Если речь идет о процессе адаптации к новым условиям обитания, то направление фенотипического сдвига в разных условиях может совпадать или не совпадать с направлением отбора в новой нише или оно вообще не будет с ним связано. При таком подходе роль ФП представляется не такой однозначной, как это было ранее описано. Ниже будут более подробно рассмотрены различные варианты соотношения между направлением ФП и векторами отбора в ходе адаптации к различающимся условиям обитания.

Роль отбора в формировании ФП изучена недостаточно, а существующие данные имеют отрывочный характер. Например, было показано, что головастики *Rana sylvatica*, воспитанные в присутствии личинок стрекоз, демонстрируют сдвиг тех же фенотипических признаков и в том же направлении, в котором происходит сдвиг в результате дифференциальной элиминации, если личинкам стрекоз предоставлена возможность питаться головастиками [14]. Т.е. отбору оказались подвержены наиболее пластичные признаки. Авторы делают вывод, что пластичность признаков определяется наличием или отсутствием хищников в водоеме, поскольку головастики, воспитывавшиеся в присутствии личинок стрекоз, имеют более низкие показатели жизнеспособности, чем головастики, разводимые изолированно от этих хищников.

Эффективность влияния отбора на уменьшение ФП была продемонстрирована в серии экспериментов с растениями *Arabidopsis thaliana*, которые выращивали в различных условиях затенения [15]. Опыт был поставлен в четырех вариантах: развитие растения при постоянном затенении, развитие без затенения, затенение до выхода растения в стрелку с последующим развитием без затенения, развитие без затенения до выхода в стрелку с последующим затенением. Оказалось, что у одних признаков положительный селекционный сдвиг сопровождался уменьшением ФП, а у других отрицательный селекционный сдвиг не сопровождался изменением ФП.

В некоторых эволюционных экспериментах на дрозофиле и мышах было показано, что в ходе отбора происходит повышение ФП по отбираемому признаку [16]. Авторы предполагают, что в этом

случае отбору могут подвергаться аллели, обеспечивающие высокую ФП.

Наконец, математические модели предсказывают сохранение ФП на низком уровне по признакам, связанным с половым отбором, который обеспечивает соответствие половых партнеров при спаривании [17].

К сожалению, недостаток фактических данных в настоящее время не позволяет описать закономерности формирования ФП под действием отбора и иных эволюционных факторов.

2. Влияние среды на устойчивость онтогенеза и изменчивость. Стабилизирующая и дестабилизирующая ФП

Колебания условий среды могут влиять на устойчивость онтогенеза и изменять масштаб наблюдаемой ФП. Эти изменения можно трактовать как стабилизирующую (канализирующую) или дестабилизирующую (диверсифицирующую) ФП. Умеренные стрессовые воздействия среды могут снижать изменчивость. Например, у *Caenorhabditis elegans* тепловой шок, повышая уровень экспрессии шаперонов, подавляет фенотипическое проявление (снижает пенетрантность) ряда вредных мутаций, тем самым повышая устойчивость развития [18]. Это случай стабилизирующего средового воздействия на онтогенез и фенотип. Стабилизирующая ФП (как и адаптивная ФП, см. ниже) способствует накоплению скрытой генетической изменчивости, которая может проявиться при смене условий и повышать шансы популяции на успешную адаптацию. Экспериментальное подтверждение положительного влияния скрытой изменчивости на приспособляемость было получено в эволюционном эксперименте на искусственных репликаторах — рибозимах, способных к дарвиновской эволюции *in vitro* [19].

Средовые воздействия, нарушающие работу стабилизирующих механизмов и обратных связей в ходе онтогенеза, могут приводить к дестабилизации развития, что проявляется в росте флуктуирующей асимметрии [20, 21] или во взрывном проявлении скрытой изменчивости, которая при этом становится материалом для отбора [22, 23]. Например, у рыб *Astyanax mexicanus*, представленных слепыми пещерными и зрячими поверхностными популяциями, переход из поверхностных водоемов в пещерные приводит к снижению экспрессии шаперона Hsp90. Показано, что ключевую роль в этом играет пониженная электрическая проводимость пещерных вод, хотя конкретные механизмы влияния электропроводимости воды на экспрессию Hsp90 остались невыясненными. Снижение экспрессии Hsp90 ведет к проявлению скрытой изменчивости по размеру глаз: появляются особи как с резко увеличенными, так и с редуцированными глазами (пример дестабилизирующей ФП). Новые фенотипы могут быть быстро стабилизированы

при помощи скрещиваний и отбора: так, потомство от скрещивания особей с минимальным размером глаз демонстрирует этот признак даже при ненарушенной экспрессии Hsp90. В пещерных водоемах особи с редуцированными глазами имеют селективное преимущество. По-видимому, дестабилизирующая ФП сыграла ключевую роль в редукции глаз у пещерных популяций [24].

3. Адаптивная ФП как фактор, замедляющий эволюцию

Если рассматривать не уровень изменчивости в целом, а конкретные изменения, с той или иной вероятностью вызываемые средовым воздействием, то случаи ФП удобно классифицировать по их влиянию на приспособленность. Соответственно, ФП может быть неадаптивной, нейтральной или адаптивной (в последнем случае говорят об “адаптивных модификациях”). Например, если в условиях дефицита пищи мелкие особи размножаются эффективнее, чем крупные, то замедление роста в ответ на голодание — это адаптивная ФП. Если же особи, сумевшие, невзирая на скудное питание, вырасти большими, размножаются лучше мелких, то же само ненаследственное изменение следует классифицировать как неадаптивную ФП.

Адаптивная ФП может тормозить адаптивную эволюцию. Если признак в новых условиях автоматически смещается в “выгодную” сторону, приближая фенотип к оптимуму при неизменном геноме, то влияние генетического полиморфизма на признак будет замаскировано адаптивной модификацией, а действие отбора на аллели, влияющие на признак, будет ослаблено. Таким образом, адаптивная ФП может подменять собой “обычную”, генетически обусловленную, адаптацию [1, 9, 25], в том числе в эволюционных экспериментах [16].

Способность к адаптивным модификациям во многих случаях является результатом предшествующей адаптивной эволюции [26]. Для организмов, обитающих в гетерогенной среде, способность при неизменном геноме формировать оптимальный фенотип в любых условиях могла бы стать “идеальной адаптацией”. Поэтому относительная редкость адаптивной ФП в природе некоторыми авторами рассматривается как парадокс, требующий объяснения [27]. Моделирование показывает, что путь, по которому пойдет эволюция в гетерогенной среде — в сторону генетической диверсификации и формирования множества специализированных форм с низкой ФП или в сторону расширения нормы реакции и развития адаптивной ФП при минимальной генетической дивергенции — зависит от многих параметров, таких как характер пространственно-временной гетерогенности среды, подвижность и способность к расселению организмов, а также генетическая архитектура признаков, влияющих на приспособленность [27, 28].

4. Адаптивная ФП как фактор, направляющий и ускоряющий эволюцию. Генетическая ассимиляция

Адаптивная ФП может не только тормозить адаптивную эволюцию, но и ускорять и направлять ее за счет таких механизмов, как генетическая ассимиляция и эффект Болдуина [4, 5, 29]. Генетическая ассимиляция адаптивного пластического изменения может произойти под действием отбора, если в популяции исходно существует наследственная изменчивость по способности к такой модификации [30, 31]. Ускорение адаптивной эволюции при этом обеспечивается за счет того, что не нужно дожидаться, пока произойдет мутация, смещающая фенотип в сторону оптимума [1, 32].

Предложена основанная на онтогенетической пластичности модель видообразования, согласно которой новые адаптивные признаки возникают сначала как модификации, а затем подвергаются генетической ассимиляции в местах обитания с альтернативными условиями, что может привести к распаду пластичного предкового вида на два (или более) специализированных и непластичных вида-потомка [8, 9, 33]. Возможно, по этой схеме шла эволюция саламандр рода *Ambystoma*, у которых не выходящие на сушу пedomорфные формы и наземные метаморфы исходно были двумя альтернативными фенотипами, определяемыми средой (размером водоема); в дальнейшем некоторые виды стали облигатными пedomорфами, а другие — облигатными метаморфами [34].

Кроме того, ФП может способствовать видообразованию, ускоряя развитие презиготической репродуктивной изоляции, если затрагивает признаки, прямо или косвенно связанные с поиском и выбором полового партнера [1, 35, 36].

В ходе проводимого нами эволюционного эксперимента на *Drosophila melanogaster* подтвердилась возможность быстрой генетической ассимиляции адаптивных модификаций в процессе адаптации к неблагоприятным условиям. Подопытные линии культивируются на разных кормовых средах, в том числе на нормальной (благоприятной) среде Н (линия Мн) и обедненной среде на основе крахмала К (линия Мк). Переход неадаптированных мух на среду К стимулирует интенсивную откладку яиц молодыми самками, а также ускоренное репродуктивное старение, повышенную смертность и сокращение средней продолжительности жизни. Из этих пластических изменений первое является адаптивным, поскольку при высокой смертности селективное преимущество получают особи, успевающие эффективно размножиться в молодости. За год адаптации к обедненной среде (20–25 поколений) в линии Мк произошла генетическая ассимиляция повышенной ранней плодовитости. Этот признак стал наследственным и проявляется теперь на обеих кормовых средах у мух Мк, в том числе выращенных на среде Н, а также у гибридов от скрещивания Мк с Мн [37].

Стабилизирующий отбор, повышающий устойчивость реализации оптимального в данных условиях фенотипа — не единственный возможный механизм генетической ассимиляции. Ассимиляция может происходить “пассивным” путем в результате мутационной деградации регуляторных механизмов, переключающих онтогенез на альтернативный путь (например, если они долго не используются из-за стабильности среды). Моделирование эволюции онтогенеза, представляемого как сложная сеть регуляторных взаимодействий, показало, что возможен дополнительный механизм, в основе которого лежит отбор на устойчивость (канализацию) онтогенеза как такового, без привязки к тому, насколько близок к оптимуму получающийся в итоге фенотип [38]. Этот механизм допускает генетическую ассимиляцию нейтральных модификаций, т.е. вариантов пластичного признака, которые ничем не лучше других его вариантов и сами по себе не дают селективного преимущества [31].

Неадаптивные модификации могут подвергаться генетической ассимиляции, по-видимому, лишь за счет “хитчхайкинга”, если они скоррелированы с полезными признаками. Однако есть один особый случай: эволюция ускоренного старения под действием высокой неизбирательной смертности (например, при попадании в неблагоприятные условия). Сокращение продолжительности жизни в неблагоприятных условиях — пример неадаптивной ФП. Однако эволюционный эффект этого пластического изменения необычен: оно выводит поздние стадии жизненного цикла из-под действия отбора и позволяет свободно накапливаться мутациям с поздно проявляющимися вредными эффектами (в том числе плейотропным аллелям, повышающим приспособленность в молодости ценой снижения приспособленности в старшем возрасте). В условиях высокой смертности вредные эффекты таких мутаций просто не успевают проявиться в фенотипе и поэтому отбор не может помешать их накоплению [39, 40]. В результате происходит генетическая ассимиляция неадаптивного пластического изменения — сокращения продолжительности жизни, которое становится наследственным, после чего будет проявляться даже в благоприятных условиях. В нашем эволюционном эксперименте это произошло с мухами Мк, адаптировавшимися к обедненной кормовой среде на основе крахмала: результатом высокой смертности стало наследуемое сокращение продолжительности жизни [37]. Впрочем, если смертность избирательна и существует наследственная изменчивость по устойчивости к фактору, вызывающему смертность, то усиление последней может привести к обратному эффекту — увеличению продолжительности жизни [41, 42], что можно интерпретировать как пример генетической компенсации (см. ниже).

Некоторые российские эволюционисты асболютизируют роль дестабилизирующей и адаптивной ФП, полагая, что новые адаптации и виды *всегда*

возникают по схеме “изменение среды — дестабилизация онтогенеза — появление новых, в том числе адаптивных фенотипов при неизменном геноме — генетическая ассимиляция”. Так, в работе Шишкина на стр. 181 утверждается, что *“эволюционные изменения начинаются с фенотипа и распространяются по мере их стабилизации в направлении генома, а не наоборот”* [43]. Эти взгляды позиционируются как особая “эпигенетическая теория эволюции”, принципиально несовместимая с классическими представлениями, согласно которым эволюционные изменения начинаются с генотипа [43–46]. На наш взгляд, для абсолютизации данного сценария нет оснований, поскольку существует множество примеров хорошо изученных эволюционных событий, которые явно шли не по этой схеме [47]. Вряд ли оправдано и столь резкое противопоставление “эпигенетической теории” общепринятым взглядам. В англоязычной литературе очень близкие идеи и подкрепляющие их факты обсуждаются в конструктивном ключе как развивающие, но вовсе не отменяющие классические взгляды [1, 8, 9, 48].

5. Неадаптивная ФП как фактор, замедляющий эволюцию

Подобно адаптивной ФП, неадаптивная ФП тоже может как замедлять, так и ускорять эволюцию в зависимости от обстоятельств. Простейший пример неадаптивной ФП — снижение плодовитости, сексуальной привлекательности, уровня иммунной защиты или других влияющих на приспособленность параметров фенотипа при изменении среды. Такие пластические изменения могут блокировать адаптацию, ставя под угрозу само выживание популяции в новых условиях.

Даже если популяция выживет и начнет адаптироваться к неблагоприятной среде, формирующиеся адаптации поначалу будут замаскированы неадаптивной ФП. Это может привести к тому, что мигранты из благоприятных местообитаний, не имеющие генетических адаптаций к данной среде, тем не менее, будут побеждать в конкуренции и вытеснять адаптированных аборигенов. Идея о возможности такого механизма негативного влияния неадаптивной ФП на адаптацию и дивергенцию высказывалась ранее [9], однако, насколько нам известно, не имела экспериментальных подтверждений. Нам удалось их получить в рамках упомянутого выше эволюционного эксперимента [49]. После 10 поколений экспериментальной эволюции линии Мн и Мк продемонстрировали различия по приспособленности к кормовым средам Н и К, кажущиеся парадоксальными: они проигрывают в конкуренции чужакам на “своей” среде и побеждают на “чужой”. Мы предположили, что низкая приспособленность мух Мк к среде К объясняется материнским эффектом (“эффектом голодной матери”), представляющим собой вариант

неадаптивной ФП. Возможно, мухи Мк в действительности выработали адаптации к среде К, которые, однако, маскируются тем, что самки, выращенные на обедненной среде, производят яйца с меньшим запасом дефицитных веществ. Вышедшие из таких яиц личинки успешно развиваются на богатой среде Н, но отстают в развитии на обедненной среде К. Для проверки гипотезы была оценена приспособленность мух, в течение одного поколения выращивавшихся на среде Н с целью устранения неадаптивной ФП. В соответствии с ожиданиями, после этой процедуры мухи Мк продемонстрировали повышенную приспособленность к среде К по сравнению с Мн. Этот результат согласуется с идеей о том, что неадаптивная ФП может маскировать адаптацию к неблагоприятной среде и препятствовать дивергенции, позволяя мигрантам из благоприятных местообитаний выигрывать в конкуренции на неблагоприятных субстратах у резидентных особей, уже имеющих адаптации к ним [49].

6. Неадаптивная ФП как фактор, ускоряющий эволюцию. Генетическая компенсация

Неадаптивная ФП может не только замедлять адаптивную эволюцию, но и ускорять ее; направленность пластических и эволюционных изменений в этом случае будет противоположной. Предполагаемый механизм основан на том, что неадаптивная ФП смещает признак в сторону, противоположную оптимуму, тем самым усиливая действие отбора на признак. Такой отбор называют “отбором против градиента среды” (countergradient selection). Например, для многих пойкилотермных животных характерно замедление развития при понижении температуры. Это не способствует адаптации к высоким широтам, где из-за короткого лета выгодно, наоборот, развиваться быстрее. В такой ситуации неадаптивная ФП способствует усилению отбора на ускоренное развитие. В результате происходит “генетическая компенсация”: неадаптивные пластические изменения компенсируются адаптивными наследственными [50]. Так может сложиться ситуация, когда популяции, адаптированные к жизни в холодных и теплых районах, демонстрируют сходный темп развития в своих естественных местообитаниях, но в одинаковых температурных условиях адаптированные к холоду особи будут развиваться быстрее. Это явление называют “криптической эволюцией”, поскольку генетически различающиеся популяции демонстрируют сходный фенотип в естественных для них условиях. Данный термин приложим и к описанной выше ситуации, когда адаптация к неблагоприятной кормовой среде маскируется неадаптивной ФП.

Убедительное подтверждение того, что неадаптивная ФП может направлять эволюцию в сторону, противоположную направленности пластических изменений, получено в ходе изучения тринидадских

группы (*Poecilia reticulata*), ставших классическим объектом эволюционных исследований благодаря работам Д. Эндлера и Д. Резника. Направленность отбора, действующего на *P. reticulata*, зависит от наличия или отсутствия хищников (цихлид *Crenicichla frenata*). Хищники осуществляют отбор на ускоренное половое созревание и покровительственную окраску. Если хищников нет, главным фактором отбора становится внутривидовая конкуренция, и тогда преимущество получают поздно созревающие особи и ярко окрашенные самцы [51, 52]. Эти различия основаны на изменении экспрессии множества генов. Было выявлено 135 генов, экспрессия которых сходным образом изменилась у разных популяций, независимо друг от друга освоивших водоёмы без хищников. Эти генетически обусловленные и, по-видимому, адаптивные изменения были сопоставлены с пластическими изменениями экспрессии тех же генов, которые происходят у рыб, адаптированных к присутствию хищников, если поместить их в воду, где запах хищника отсутствует. Оказалось, что у большинства (89%) рассматриваемых генов пластическое изменение экспрессии направлено в сторону, противоположную эволюционно выгодной [53]. Таким образом, почти вся выявленная ФП оказалась неадаптивной. Разумеется, это не значит, что неадаптивность внутренне присуща ФП. Направленность пластических изменений экспрессии, скорее всего, случайна (не зависит от собственного влияния на приспособленность). Группы в природе редко переселяются в новый водоём, где количество хищников сильно отличается от привычного. Поэтому отбор не мог обеспечить группы надежным механизмом адаптивной ФП. Однако от направленности пластических изменений зависит дальнейший ход эволюции. Если пластическое изменение оказалось неадаптивным, отбор сильнее действует на признак, смещая его в сторону оптимума. Данная интерпретация согласуется с тем, что у популяций, адаптированных к отсутствию хищников, пластичность уровня экспрессии изученных генов понижена. Поскольку эта пластичность неадаптивна, отбор работает против нее, сужая норму реакции [53].

8. Изменения симбиотической микробиоты как особый случай ФП

Важную роль в жизни многоклеточных организмов играет симбиотическая микробиота, которая может передаваться от родителей к потомкам, но может и относительно быстро меняться при смене условий [54]. В частности, микробиом *D. melanogaster* влияет на скорость роста личинок, их выживаемость в неблагоприятных условиях, продолжительность жизни имаго и эффективность использования кормовых субстратов [55–57]. Мухи переносят бактериальные и дрожжевые клетки в кишечнике и на поверхности тела, а поедание личинками суб-

страта, на котором жили их родители, обеспечивает передачу микробиома в ряду поколений [56, 57].

В ходе эволюционного эксперимента на *D. melanogaster* нами получены данные, указывающие на важный вклад изменений микробиома в адаптацию мух к кормовой среде с высоким (4%) содержанием NaCl. Для диких *D. melanogaster* концентрация соли в корме, превышающая 2%, является неблагоприятным фактором, вызывающим задержку развития личинок и повышенную смертность. Однако за несколько десятков поколений лабораторные линии *D. melanogaster* могут приспособиться к концентрациям NaCl до 6–8% [5, 58]. Этот результат подтвердился в ходе нашего эксперимента [59]. Для проверки гипотезы о вкладе микробиоты в адаптацию мы сравнили эффективность размножения и скорость развития *D. melanogaster* на солёной кормовой среде, на которую был предварительно нанесен гомогенат мух из адаптированных к ней лабораторных линий (Mc) либо из контрольных линий (Mn). Оказалось, что присутствие гомогената мух Mc повышает эффективность размножения мух на солёном корме и ускоряет развитие личинок. Этот результат согласуется с предположением о вкладе микробиоты в адаптацию *D. melanogaster* к солёному корму.

Адаптации, обусловленные изменениями микробиоты, можно рассматривать как особый случай адаптивной ФП (поскольку фенотип организма-хозяина меняется при неизменном геноме под влиянием среды). Они должны отличаться от “обычных” генетических адаптаций пониженной наследуемостью и неустойчивостью. Хотя микробиота *D. melanogaster* передается от родителей к потомкам благодаря питанию личинок субстратом, на котором жили родители, ее состав меняется при смене кормового субстрата [56]. Подобно обычной ФП, такие адаптации могут влиять на эволюцию организма-хозяина. Быстрые адаптивные изменения микробиома, облегчающие выживание хозяина в неблагоприятных условиях, могут служить “эволюционным буфером”, ослабляя действие отбора и замедляя эволюцию хозяина.

Может показаться, что обычные адаптивные модификации принципиально отличаются от “адаптаций за счет микробиома” тем, что первые не наследуются, а вторые могут наследоваться путем вертикальной передачи симбионтов. Интересно, что адаптации, наследуемые таким способом, способны к “квазиламарковской” эволюции: микробиом, изменившийся в течение жизни родителя, может быть непосредственно передан потомку [60]. Однако в ряде случаев всё это справедливо и для обычной ФП, не связанной с микробиомом. Например, прижизненные модификации поведенческих признаков, составляющих важную часть фенотипа высших животных, могут наследоваться посредством социального обучения [61], с возможностью генетической ассимиляции за счёт эффекта Болдуина [29]. Для ряда пластических изменений

показана возможность наследования за счёт материнских эффектов [62] или эпигенетических модификаций генома [63].

ФП, основанная на изменениях микробиома, может быть и неадаптивной, со всеми вытекающими следствиями. Яркий пример — влияние кишечных бактерий на социальное поведение млекопитающих. Для потомства самок мышей, питавшихся жирной пищей, характерно нарушенное социальное поведение. Причина — в снижении численности бактерии *Lactobacillus reuteri* в кишечнике самок, которые передают изменённую микробиоту потомству во время вскармливания. Недостаток *L. reuteri* ведет к недоразвитию окситоцинергических нейронов гипоталамуса у мышат; это снижает реакцию дофаминергических нейронов вентральной области покрышки (VTA) на социальные стимулы; как следствие, у животных пропадает интерес к общению. Эти патологические симптомы не

развиваются, если мышатам начиная с трёхнедельного возраста добавлять *L. reuteri* в питьевую воду [64]. Выводы, полученные в экспериментах на мышах, могут иметь значение и для людей [65].

Таким образом, эволюционная роль ФП, по-видимому, важнее и разнообразнее, чем считалось в течение ряда десятилетий после торжества центральной догмы. Тот факт, что пластические изменения не могут быть напрямую “вписаны” в геном, не означает, что они несущественны для эволюции и могут игнорироваться в учебниках и обобщающих трудах по эволюционной биологии. Изучение эволюционной роли ФП по существу только начинается. Экспериментальная эволюция является одним из перспективных подходов, позволяющим в деталях проследить влияние ФП на ход адаптации организмов к изменчивым условиям среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-14-00330).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pfennig D.W., Wund M.A., Snell-Rood E.C., Cruickshank T., Schlichting C.D., Moczek A.P. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation // Trends Ecol. Evol. 2010. Vol. 25. N 8. P. 459–467.
2. Scheiner S.M., Caplan R.L., Lyman R.F. The genetics of phenotypic plasticity. III. Genetic correlations and fluctuating asymmetries // J. Evolution. Biol. 1991. Vol. 4. N 1. P. 51–68.
3. Schmalhausen I.I. Factors of evolution: The theory of stabilizing selection. Philadelphia: Blakiston Company, 1949. 327 p.
4. Waddington C.H. Genetic assimilation of acquired characters // Evolution. 1953. Vol. 7. N 2. P. 118–126.
5. Waddington C.H. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters // Nature. 1959. Vol. 183. N 4676. P. 1654–1655.
6. Иорданский Н.Н. Фенотипическая пластичность организмов и эволюция // Журн. общей биологии. 2009. Т. 70. № 1. С. 3–9.
7. Price T.D., Qvarnström A., Irwin D.E. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution // Proc. Biol. Sci. 2003. Vol. 270. N 1523. P. 1433–1440.
8. West-Eberhard M.J. Developmental plasticity and the origin of species differences. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005. Vol. 102. N 1. P. 6543–6549.
9. Fitzpatrick B.M. Underappreciated consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation // Int. J. Ecol. Evol. 2012. Vol. 2012. Article ID 256017.
10. Sultan S.E. Development in context: the timely emergence of eco-devo // Trends Ecol. Evol. 2007. Vol. 22. N 11. P. 575–582.
11. Gilbert S.F., Epel D. Ecological developmental biology: integrating epigenetics, medicine, and evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., 2008. 375 p.
12. Kawecki T.J., Lenski R.E., Ebert D., Hollis B., Olivieri I., Whitlock M.C. Experimental evolution // Trends Ecol. Evol. 2012. Vol. 27. N 10. P. 547–560.
13. Falconer D.S., Mackay T.F.C. Introduction to quantitative genetics. London: Longman, 1996. 464 p.
14. Buskirk J., Relyea R. Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles // Biol. J. Linn. Soc. 1998. Vol. 65. N 3. P. 301–328.
15. Scheiner S.M., Callhan H.C. Measuring natural selection on phenotypic plasticity // Evolution. 1999. Vol. 53. N 6. P. 1704–1713.
16. Garland T., Jr, Kelly S.A. Phenotypic plasticity and experimental evolution // J. Exp. Biol. 2006. Vol. 209. N 12. P. 2344–2361.
17. Nonaka E., Brannstrom A., Svanback R. Assortative mating can limit the evolution of phenotypic plasticity // Evol. 2014. Vol. 28. N 6. P. 1057–1074.
18. Casanueva M.O., Burga A., Lehner B. Fitness trade-offs and environmentally induced mutation buffering in isogenic *C. elegans* // Science. 2012. Vol. 335. N 6064. P. 82–85.
19. Hayden E.J., Ferrada E., Wagner A. Cryptic genetic variation promotes rapid evolutionary adaptation in an RNA enzyme // Nature. 2011. Vol. 474. N 7349. P. 92–95.
20. Polak M. Developmental instability: causes and consequences. Oxford: Oxford Univ. Press, 2003. 488 p.
21. De Coster G., Van Dongen S., Malaki P., Muchane M., Alcántara-Exposito A., Matheve H., Lens L. Fluctuating asymmetry and environmental stress: understanding the role of trait history // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. N 3. e57966.
22. Rutherford S.L., Lindquist S. HSP90 as a capacitor for morphological evolution // Nature. 1998. Vol. 396. N 6709. 336–342.
23. Queitsch C., Sangster T.A., Lindquist S. HSP90 as a capacitor of phenotypic variation // Nature. 2002. Vol. 417. N 6889. P. 618–624.
24. Rohner N., Jarosz D.F., Kowalko J.E., Yoshizawa M., Jeffery W.R., Borowsky R.L., Lindquist S., Tabin C.J. Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish // Science. 2013. Vol. 342. N 6164. P. 1372–1375.
25. DeWitt T.J., Scheiner S.M. Phenotypic variation from single genotypes: a primer // Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches / Eds. T.J. DeWitt and S.M. Scheiner. USA, New York, NY: Oxford Univ. Press, 2004. P. 1–9.
26. Suzuki Y., Nijhout H.F. Evolution of a polyphenism by genetic accommodation // Science. 2006. Vol. 311. N 5761. P. 650–652.

27. *Scheiner S.M., Holt R.D.* The genetics of phenotypic plasticity. X. Variation versus uncertainty // *Ecol. Evol.* 2012. Vol. 2. N 4. P. 751–767.
28. *Sultan S., Spencer H.G.* Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation // *Am. Nat.* 2002. Vol. 160. N 2. P. 271–283.
29. *Crispo E.* The Baldwin effect and genetic assimilation: revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity // *Evolution.* 2007. Vol. 61. N 11. P. 2469–2479.
30. *Bateman K.G.* The genetic assimilation of the dumpy phenocopy // *J. Genet.* 1959. Vol. 56. N 3. P. 341–351.
31. *Masel J.* Genetic assimilation can occur in the absence of selection for the assimilating phenotype, suggesting a role for the canalization heuristic // *J. Evol. Biol.* 2004. Vol. 17. N 5. P. 1106–1110.
32. *Phillips P.C.* Waiting for a compensatory mutation: phase zero of the shifting-balance process // *Genet. Res.* 1996. Vol. 67. N 3. P. 271–283.
33. *West-Eberhard M.J.* Alternative adaptations, speciation, and phylogeny // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986. Vol. 83. N 5. P. 1388–1392.
34. *Matsuda R.* The evolutionary process in talitrid amphipods and salamanders in changing environments, with a discussion of “genetic assimilation” and some other evolutionary concepts // *Can. J. Zool.* 1982. Vol. 60. N 5. P. 733–749.
35. *Smith T.B., Skúlason S.* Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1996. Vol. 27. P. 111–133.
36. *Sharon G., Segal D., Ringo J.M., Hefetz A., Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E.* Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster* // *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107. N 46. P. 20051–20056.
37. *Markov A.V., Naimark E.B., Yakovleva E.U.* Temporal scaling of age-dependent mortality: Dynamics of aging in *Caenorhabditis elegans* is easy to speed up or slow down, but its overall trajectory is stable // *Biochemistry (Mosc.)* 2016. Vol. 81. N 8. P. 906–911.
38. *Siegal M.L., Bergman A.* Waddington’s canalization revisited: developmental stability and evolution // *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99. N 16. P. 10528–10532.
39. *Williams G.C.* Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence // *Evolution.* 1957. Vol. 11. N 4. P. 398–411.
40. *Hamilton W.D.* The moulding of senescence by natural selection // *J. Theor. Biol.* 1966. Vol. 12. N 1. P. 12–45.
41. *Williams P.D., Day T., Fletcher Q., Rowe L.* The shaping of senescence in the wild // *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 21. N 8. P. 458–463.
42. *Chen H., Maklakov A.A.* Longer life span evolves under high rates of condition-dependent mortality // *Curr. Biol.* 2012. Vol. 22. N 22. P. 2140–2143.
43. *Shishkin M.A.* Development and lessons of // *Russ. J. Dev. Biol.* 2006. Vol. 37. N 3. P. 146–162.
44. *Раутиан А.С.* О природе генотипа и наследственности // *Журн. общ. биол.* 1993. Т. 54. № 2. С. 131–148.
45. *Гродницкий Д.Л.* Эпигенетическая теория эволюции как возможная основа нового эволюционного синтеза // *Журн. общ. биол.* 2001. Т. 62. № 2. С. 99–109.
46. *Шишкин М.А.* Эволюция как эпигенетический процесс // *Современная палеонтология* Т. 2. / Под ред. В.В. Меннера и В.П. Макридина. М.: Недра, 1988. С. 142–169.
47. *Марков А.В., Наймарк Е.Б.* Эволюция. Классические идеи в свете новых открытий. М.: Corpus, 2014. 656 с.
48. *Minelli A., Fusco G.* Developmental plasticity and the evolution of animal complex life cycles // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2010. Vol. 365. N 1540. P. 631–640.
49. *Марков А.В., Ивницкий С.Б., Корнилова М.Б., Наймарк Е.Б., Широкова Н.Г., Перфильева К.С.* Материнский эффект маскирует адаптацию к неблагоприятным условиям и затрудняет дивергенцию у *Drosophila melanogaster* // *Журн. общ. биол.* 2015. Т. 76. № 6. С. 429–437.
50. *Grether G.F.*, 2005. Environmental change, phenotypic plasticity, and genetic compensation // *Am. Nat.* Vol. 166. N 4. P. E115–E123.
51. *Reznick D.N., Shaw F.H., Rodd F.H., Shaw R.G.* Evaluation of the rate of evolution in natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*) // *Science.* 1997. Vol. 275. N 5308. P. 1934–1937.
52. *Reznick D.N., Bryant M.J., Roff D., Ghalambor C.K., Ghalambor D.E.* Effect of extrinsic mortality on the evolution of senescence in guppies // *Nature.* 2004. Vol. 431. N 7012. P. 1095–1099.
53. *Ghalambor C.K., Hoke K.L., Ruell E.W., Fischer E.K., Reznick D.N., Hughes K.A.* Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature // *Nature.* 2015. Vol. 525. N 7569. P. 372–375.
54. *Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E.* Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. Vol. 32. N 5. P. 723–735.
55. *Shin S.C., Kim S.H., You H., Kim B., Kim A.C., Lee K.A., Yoon J.H., Ryu J.H., Lee W.J.* *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling // *Science.* 2011. Vol. 334. N 6056. P. 670–674.
56. *Blum J.E., Fischer C.N., Miles J., Handelsman J.* Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster* // *MBio.* 2013. Vol. 4. N 6. e00860-13.
57. *Erkosar B., Storelli G., Defaye A., Leulier F.* Host-intestinal microbiota mutualism: “learning on the fly” // *Cell Host Microbe.* 2013. Vol. 13. N 1. P. 8–14.
58. *Arbuthnott D., Rundle H.D.* Misalignment of natural and sexual selection among divergently adapted *Drosophila melanogaster* populations // *Anim. Behav.* 2014. Vol. 87. P. 45–51.
59. *Дмитриева А.С., Ивницкий С.Б., Марков А.В.* Адаптация *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату сопровождается расширением трофической ниши // *Журн. общ. биологии.* 2016. Т. 77. № 4. С. 249–261.
60. *Bordenstein S.R., Theis K.R.* Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes // *PLoS Biol.* 2015. Vol. 13. N 8. e1002226.
61. *Aplin L.M., Farine D.R., Morand-Ferron J., Cockburn A., Thornton A., Sheldon B.C.* Experimentally induced innovations lead to persistent culture via conformity in wild birds // *Nature.* 2015. Vol. 518. N 7540. P. 538–541.
62. *Marshall D.J., Uller T.* When is a maternal effect adaptive? // *Oikos.* 2007. Vol. 116. N 12. P. 1957–1963.
63. *Dias B.G., Ressler K.J.* Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations // *Nat. Neurosci.* 2014. Vol. 17. N 1. P. 89–96.
64. *Buffington S.A., Di Prisco G.V., Auchtung T.A., Ajami N.J., Petrosino J.F., Costa-Mattioli M.* Microbial reconstitution reverses maternal diet-Induced social and synaptic deficits in offspring // *Cell.* 2016. Vol. 165. N 7. P. 1762–1775.
65. *Krakowiak P., Walker C.K., Bremer A.A., Baker A.S., Ozonoff S., Hansen R.L., Hertz-Picciotto I.* Maternal Metabolic Conditions and Risk for Autism and Other Neurodevelopmental Disorders // *Pediatrics.* 2012. Vol. 129. N 5. P. e1121–e1128.

Поступила в редакцию 18.08.2016

Принята в печать 05.09.2016

EVOLUTIONARY BIOLOGY

EVOLUTIONARY ROLE OF PHENOTYPIC PLASTICITY

A.V. Markov^{1,2}, S.B. Ivnitsky^{1,}*¹ *Department of Biological Evolution, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;*² *Borissiak Paleontological Institute,
Russian Academy of Sciences, Profsoyuznaya ul. 123, Moscow, 117997, Russia;***e-mail: ivnitsky@mail.ru*

Phenotypic plasticity, i.e., the ability of a genotype to produce various phenotypes in response to changes in the environment, plays an important, although poorly understood and often underestimated, role in evolution. Both adaptive and non-adaptive phenotypic plasticity modulate the strength and direction of selection acting on population and can, depending on conditions, either accelerate or inhibit adaptation, divergence and speciation. Phenotypic plasticity also affects the direction of evolutionary change which can either coincide with the direction of plastic changes (genetic assimilation) or be the opposite (genetic compensation). A special case of phenotypic plasticity is phenotypic change of the host caused by changes in its symbiotic microbiota. In the current review, we discuss the main forms of phenotypic plasticity and the current data on their impact on the rate and direction of evolutionary change. Special attention is paid to the results of recent experimental work, including the long-term evolutionary experiment on *Drosophila melanogaster* which is being held at the Department of Evolutionary Biology, School of Biology, Moscow State University.

Keywords: *phenotypic plasticity, evolution, adaptation, divergence, genetic assimilation, experimental evolution, review.*

Сведения об авторах

Марков Александр Владимирович — докт. биол. наук, проф. РАН, заведующий кафедрой биологической эволюции биологического факультета МГУ, вед. науч. сотр. Палеонтологического института имени А.А.Борисяка РАН. Тел.: 8-495-939-35-01; e-mail: markov_a@inbox.ru

Ивницкий Сергей Борисович — канд. биол. наук, доц. кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01; e-mail: ivnitsky@mail.ru

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 577.73

СРЕДНИЙ ВОЗРАСТ СМЕРТИ И ДОЛГОЖИТЕЛЬНОСТЬ МУЖЧИН-УЧЁНЫХ
РАЗЛИЧНЫХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙВ.Н. Анисимов^{1,2,*}, Г.М. Жаринов³

¹ Научный отдел канцерогенеза и онкогеронтологии, НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава РФ; Россия, 197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68;

² Кафедра гериатрии и организации геронтологической помощи, Российский университет дружбы народов; Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

³ Отделение лучевой терапии, Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Минздрава РФ; 197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70

*e-mail: aging@mail.ru

В статье представлены сведения о среднем возрасте смерти (СВС) 54256 профессионально занимавшихся научно-исследовательской работой мужчин, отнесенных к одному из шести научных направлений: физика, химия, математика, экономика, медицина и биология, гуманитарные науки. Дополнительно изучено влияние преподавательской деятельности ученых разных специальностей на СВС и долгожительство. Отдельно рассмотрены данные об умерших членах Российской академии наук, а также Академии наук СССР (1724–2013 гг.). Минимальным СВС оказался у математиков ($71,2 \pm 0,21$ года), а максимальным — у учёных-экономистов ($74,6 \pm 0,26$ года). Относительное число доживших до 90 лет и более либо до 100 лет и более было минимальным также у математиков: 7,59% и 0,37%, соответственно, а максимальным — у экономистов — 10,26% и 0,96%, соответственно. Показатели СВС и доля долгожителей среди ученых, получивших общественное признание, варьируют в зависимости от научной специальности. Среди членов Российской академии наук и Академии наук СССР наибольший СВС также был у экономистов ($74,7 \pm 1,05$ года), а минимальный — у математиков ($70,6 \pm 0,74$ года). У учёных, совмещающих исследовательскую работу с преподаванием в университете или колледже, СВС оказался на 3,5 года больше, чем у тех, кто не был вовлечен в преподавательскую деятельность. При этом, “прибавка” в годах была весьма значительной — от 3,1 года у экономистов и гуманитариев до 4,9 лет у математиков. Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что интенсивный научный труд способствует увеличению продолжительности жизни и долголетию.

Ключевые слова: *средний возраст смерти, долгожительство, учёные, преподаватели, члены Российской академии наук.*

Среди факторов, определяющих темп старения и продолжительность жизни человека, наряду с генетическими факторами существенную роль играют особенности образа жизни, включающие географические факторы (широта, высота над уровнем моря, регион, проживание в городе или сельской местности), уровень доходов, доступность медицинской помощи, образование и др. [1–3]. В последние годы все больший интерес привлекают данные о признаках ускоренного старения у представителей самых разных профессий [1, 2, 4–6]. С другой стороны, имеются данные о большей продолжительности жизни у людей с высоким социально-экономическим статусом, в частности у лауреатов Нобелевской премии, членов национальных академий наук, известных писателей, музыкантов и актеров [3, 7–12]. В серии работ нами были выявлены существенные различия в среднем возрасте смерти (СВС) и долголетию представителей различных творческих специальностей (литераторов, музыкантов, художников, артистов, ученых) [12–14].

Разработана и собрана база данных, включающая сведения о датах рождения и смерти более 250 тыс. человек разных профессий и специальностей, в том числе более 50 тыс., основным видом занятий которых являлась научная работа. Полученные данные свидетельствуют о том, что высокий интеллект и образование способствуют большей продолжительности жизни и долголетию.

Материал и методы

Источниками информации о датах рождения и смерти служили электронные версии “Большой советской энциклопедии” и “Большой русской биографической энциклопедии” [15, 16], включавшие все биографические сведения из “Русского биографического словаря” А.А. Половцова, “Большого энциклопедического словаря” издания Брокгауза и Ефрона, “Военной энциклопедии” издания И.В. Сытина, а также материалы из “Критико-биографического словаря русских писателей и учёных” С.А. Венгера, Энциклопедического словаря Русского

биографического института Гранат, “Еврейской энциклопедии” издания Брокгауза и Ефрона. Источником основной части информации были сайты Википедии “По странам” и “По алфавиту”, относящиеся к учёным, а также сайты “Родившиеся в... году” (с I в. н.э. до 1910 г. включительно) и сайты “Умершие в... году” (с 1910 г. до 12 декабря 2015 г. включительно) [http://ru.wikipedia.org]. В базу данных включались все люди с установленными годами рождения и смерти: всего в нее вошли сведения о 54 256 учёных. Учитывая многообразие научных дисциплин, весь контингент разделили на шесть выборок (категорий), объединявших близкие по профессиональным характеристикам специализации: физика (физика, механика, астрономия, геология), химия, математика, экономика, медицина и биология, гуманитарные науки (философия, филология, история, социология, география, искусствоведение). В случае, если ученый работал в двух дисциплинах, он учитывался в каждой. Дополнительно было изучено влияние преподавательской деятельности ученых разных специальностей на их СВС и долгожительство. Отдельно рассмотрены данные об умерших членах Российской академии наук (РАН), включая членов Академии наук (АН) СССР (в том числе и о действительных членах и членах-корреспондентах), со времени ее основания в 1724 г. до объединения с РАМН и РАСХН в 2013 г. В работе использованы “грубые” показатели без стандартизации по историческому периоду, стране и т.д. Для каждой категории рассчитывали СВС. Достоверность различий показателей между группами определяли с помощью методов Фишера–Стьюдента и χ^2 [17].

Результаты и обсуждение

Характер распределения СВС для всей когорты учёных, представленного на рисунке, свидетельствует о его близости к распределению Гумбеля [17]. Некоторое отличие теоретического распределения

от наблюдаемого в нашей выборке в области малых возрастов (<25 лет) легко учитывается введением обрезавшей функции. СВС 54256 мужчин — представителей разных наук — составил 72,0 года (табл. 1). Минимальным СВС оказался у математиков (71,2±0,21 года), а максимальным — у учёных-экономистов (74,6±0,26 года). Относительное число доживших до 90 лет и более либо до 100 лет и более было минимальным также у математиков: 7,59% и 0,37%, соответственно, а максимальным у экономистов — 10,26% и 0,96%, соответственно. Показатели СВС и доля долгожителей среди ученых, получивших общественное признание, варьируют в зависимости от научной специальности. Среди членов РАН и АН СССР наибольшим СВС также был у экономистов (74,7±1,05 года), а минимальным — у математиков (70,6±0,74 года) (табл. 2). Интересно, что СВС 423 выдающихся экономистов США на 2,3 года выше, чем у 177 выдающихся американских математиков (68,6±0,596 и 66,62±1,07, соответственно) [18].

В ряде исследований показано, что высокий социальный статус положительно согласуется с долголетием [1, 2, 19]. Показатель СВС лауреатов Нобелевской премии на 6,3 года превышает таковой у отечественных академиков и на 8,5 лет — у прочих учёных [8].

Ранее нами была обнаружена положительная корреляция СВС со степенью общественного признания ученого (лауреаты Нобелевской премии > академики РАН > члены-корреспонденты РАН > прочие ученые) в физике, химии и медицине/биологии, тогда как среди представителей гуманитарных дисциплин такой зависимости не наблюдалось [12, 19]. По данным В.Г. Берёзкина и А.Л. Буляницы [11], средняя продолжительность жизни академиков АН СССР и РАН (75 лет), по сравнению с этим показателем для нобелевских лауреатов-мужчин, меньше на 2,8 года, а членов-корреспондентов (72 года) —

Таблица 1

Средний возраст смерти и относительное число долгожителей среди мужчин-учёных разных специальностей (указаны ошибки среднего)

Категория	Количество	Средний возраст смерти, лет	Прожившие 90 и более лет		Прожившие 100 и более лет	
			абс.	%	абс.	%
Физика	8831	73,6±0,14*	863	9,77	53	0,60
Химия	3654	73,4±0,22*	373	10,21	21	0,57
Математика	4925	71,2±0,21*	374	7,59	18	0,37
Экономика	2593	74,6±0,26	266	10,26	25	0,96
Медицина и биология	14 351	71,7±0,12*	1199	8,35	83	0,58
Гуманитарные науки	24 895	71,5±0,09*	1929	7,75	184	0,74
Всего	54 256	72,0±0,06	4563	8,41	365	0,67

Различие с показателем для учёных-экономистов достоверно, * — $p < 0,001$.

Таблица 2

Средний возраст смерти и относительное число долгожителей среди мужчин членов РАН и АН СССР разных специальностей (указаны ошибки среднего)

Категория	Количество	Средний возраст смерти, лет	Прожившие 90 и более лет		Прожившие 100 и более лет	
			абс.	%	абс.	%
Физика	1144	73,6±0,35	86	7,52	2	0,17
Химия	402	73,2±0,60	35	8,71	2	0,50
Математика	319	70,6±0,74*	17	5,33	1	0,31
Экономика	105	74,7±1,05	6	5,71	1	0,95
Медицина и биология	535	72,4±0,52*	36	6,73	0	0
Гуманитарные науки	1011	71,7±0,36*	42	4,15	2	0,20
Всего	3148	72,4±0,21	192	6,10	7	0,22

Различие с показателем для экономистов достоверно, * — $p < 0,001$.

на 5,7 года [6], тогда как в Российской Федерации показатель средней ожидаемой продолжительности жизни для мужского населения в 1988–1989 гг. составил 64,4 года. Поскольку подавляющее большинство нобелевских лауреатов жили и живут в США, это обстоятельство, естественно, сказывается на таких различиях в показателях продолжительности жизни. Долголетие членов РАН не следует переоценивать. Несмотря на то, что продолжительность жизни у академической элиты на 2–3 года превышала её показатель для всех российских мужчин с высшим образованием, она была на 3,5 года меньше, чем у членов Королевского общества Великобритании (академии наук Великобритании) и на 1,5–3 года меньше, чем у шведов, занятых умственным трудом [10].

Биологический возраст 70-летних шведов, рожденных в 1922 г., оцениваемый по психометрическим тестам, оказался достоверно меньшим по сравнению с таковым у 70-летних, рожденных в 1906/1907 гг., что соответствовало более высокому уровню образования [20]. Доказано, что получившие высшее образование живут дольше и меньше болеют [21]. Установлено, что мозг без нагрузки стареет гораздо быстрее [22]. Ожидаемая продолжительность жизни лиц, окончивших колледж, превышала на 6 лет соответствующий показатель для лиц, не имеющих высшего образования [1]. Однако на Окинаве 18% мужчин и 42% женщин в возрасте 100 и более лет никогда не посещали школу; это свидетельствует о том, что высокий уровень образования — не универсальный фактор, способствующий долголетию во всех регионах [25]. В ряде исследований выявлена существенная взаимосвязь уровня коэффициента интеллекта IQ (Intelligence Quotient), состояния здоровья человека и показателей смертности [23, 24]. IQ определяет поведение человека, которое зачастую служит причиной разных

заболеваний. Среди лиц с высоким уровнем IQ относительное число прекративших курение было большим, чем среди тех, у которых умственные способности были ниже среднего. Следует отметить, что IQ влияет на продолжительность жизни вне зависимости от социальных факторов.

Различия в показателях продолжительности жизни между учеными разных специальностей могут быть обусловлены как уровнем жизни (образование у экономистов и “чистых” математиков одинаковое, но уровень доходов у первых может быть существенно выше), так и особенностями их профессиональной деятельности (например, профессиональные вредности) и, возможно, уровнем интеллекта. Этот вопрос требует специального изучения. Недавно было показано, что у лиц с высоким уровнем образования теломеры (конечные участки хромосом) длиннее, чем у малообразованных [26–29].

Довольно неожиданным наблюдением стало обнаружение зависимости между преподаванием и долголетием. Как можно судить по данным, представленным в табл. 3, у учёных, совмещающих исследовательскую работу с преподаванием в университете или колледже, СВС был на 3,5 года больше, чем у тех, кто не был вовлечен в преподавательскую деятельность. При этом “прибавка” в годах оказалась весьма значительной — от 3,1 года у экономистов и гуманитариев до 4,9 лет у математиков. Можно предположить, что моральное удовлетворение учёного, испытываемое им при передаче своих знаний молодежи, самым положительным образом сказывается на его здоровье и долголетию [30].

В последние годы заметно выросло число учёных, проживших 100 и более лет [31]. До начала XX века был зарегистрирован лишь один европейский учёный, перешагнувший 100-летний рубеж: иностранный член-корреспондент РАН француз Мишель Шеврёль (1786–1889). К концу XX века их уже насчитывалось 34 [31]. Следует отметить, что

Таблица 3

Средний возраст смерти и относительное число долгожителей мужчин-учёных разных специальностей с учетом преподавательской деятельности (указаны ошибки среднего)

Категория	Преподавание	Количество	Средний возраст смерти, лет		Прожившие 90 и более лет		Прожившие 100 и более лет	
			M± m	Δ	абс.	%	абс.	%
Физика	Да	3541	75,5±0,22		432	12,20	23	0,65
	Нет	5290	72,3±0,19*	−3,2	431	8,15	30	0,57
Химия	Да	1748	75,5±0,31		224	12,81	10	0,57
	Нет	1906	71,5±0,32*	−4,0	149	7,82	11	0,58
Математика	Да	3022	73,1±0,24		268	8,87	14	0,46
	Нет	1903	68,2±0,35*	−4,9	106	5,57	4	0,21
Экономика	Да	1126	76,3±0,36		120	10,66	8	0,71
	Нет	1467	73,2±0,37*	−3,1	146	9,95	17	1,16
Медицина и биология	Да	5847	74,3±0,17		679	11,61	48	0,82
	Нет	8504	69,8±0,16*	−4,5	520	6,11	35	0,41
Гуманитарные науки	Да	12740	73,1±0,12		1149	9,02	121	0,95
	Нет	12155	70,0±0,13*	−3,1	780	6,42	63	0,52
Всего	Да	25447	73,8±0,08		2609	10,25	213	0,84
	Нет	28809	70,3±0,09*	−3,5	1954	6,78	152	0,53

Различие с показателями для учёных-преподавателей той же специальности достоверно, * — $p < 0,001$.

эта выборка далеко не полная, поскольку в ней не представлены данные о учёных этой категории из Китая, Японии и Индии. В нашей базе данных имеются сведения о 365 мужчинах—учёных, проживших 100 и более лет (табл. 1). Среди ученых-мужчин, родившихся до 31.12.1899 (33 389 человек), пере-

жили 100 лет 173 (0,52%). Среди родившихся после 01.01.1900 (20 867 человек), — 192 (0,92%). В табл. 4 представлены члены РАН и АН СССР, прожившие 100 и более лет.

Полагают, что лица, прожившие 100 лет и более, представляют собой лучший пример успешного

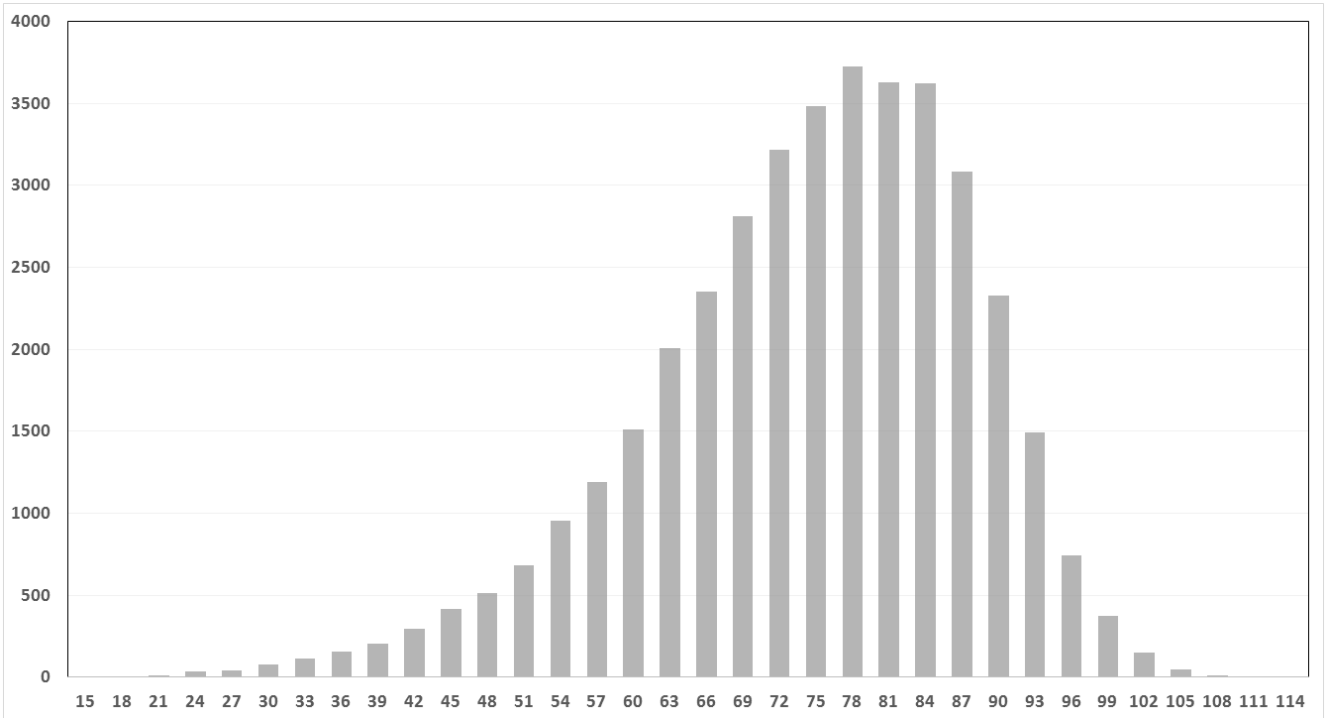


Рисунок. Гистограмма распределения среднего возраста смерти (в годах) мужчин-учёных (n = 54 256).

Таблица 4

Члены РАН (академики и члены-корреспонденты), прожившие 100 лет и более

№	Фамилия, имя	Годы жизни	Возраст, лет	Специальность
1	Никольский Сергей Михайлович (академик)	1905–2012	107	Математика
2	Шеврёль Мишель Эжен (иностранн. член-корреспондент)	1786–1889	102	Химия
3	Доллежал Николай Антонович (академик)	1899–2000	101	Энергетика
4	Шпак Владимир Степанович (академик)	1909–2009	100	Химия
5	Пистолькорс Александр Александрович (член-корреспондент)	1896–1996	100	Радиотехника
6	Дружинин Николай Михайлович (академик)	1886–1986	100	История, политэкономия
7	Шанидзе Акакий Гаврилович (член-корреспондент)	1887–1987	100	Филология

старения, поскольку у них практически отсутствуют основные ассоциированные со старением заболевания, а если они и развиваются, то значительно позднее [2, 32]. Можно также предположить, что люди с более высоким уровнем образования экономически находились в более привилегированном положении, что позволяло обеспечивать лучшее состояние здоровья и предупреждать заболевания [1, 10].

Полученные нами данные подтверждают мысль о том, что высокий интеллект и образование способствуют большей продолжительности жизни и долголетию.

“Что может человек предпринять против смерти и ее предтечи — старости? Единственным оружием человека... может быть только разум в его высшем проявлении — в науке!” — заметил 100 лет назад приват-доцент Петроградского университета П.Ю. Шмидт [33]. Исследования последних лет

полностью подтверждают этот тезис нашего соотечественника [34] и позволяют предположить, что интенсивный научный труд является фактором, способствующим долголетию. Значительный объем созданной базы данных о продолжительности жизни лиц разных творческих профессий требует углубленного анализа материала с привлечением математиков, генетиков, физиологов и психологов. В зарубежной литературе встречаются отдельные работы подобного рода, однако объем выборок в них несравнимо меньший, что позволяет полагать, что дальнейшие исследования в этом направлении могут дать высокоприоритетные результаты.

Авторы выражают глубокую признательность программисту А.С. Чиркову, создавшему систему получения и обработки информации, без которой выполнение этой работы было бы невозможным, и проф. Л.М. Баскину за критические замечания и ценные советы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schulz-Aellen M.-F.* Aging and human longevity. Boston: Birkhauser, 1997. 283 p.
2. *Анисимов В.Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения: [в 2 т.] / 2-е изд., перераб. и доп. СПб.: Наука, 2008. Т. 1. — 481 с.; Т.2. — 434 с.
3. *Fitzpatrick R.* Social status and mortality // *Ann. Intern. Med.* 2001. Vol. 134. N 10. P. 1001–1019.
4. *Анисимов В.Н.* Синдром ускоренного старения при воздействии канцерогенных факторов окружающей среды // *Рос. физиол. журн.* 2010. Т. 96. № 8. С. 817–833.
5. *Пучкова Е.И., Алишев Н.В.* Показатели биологического возраста и ускоренное старение у ликвидаторов последствий радиационных аварий // *Усп. геронтол.* 2011. Т. 24. №1. С. 99–104.
6. *Bashkireva A.S.* Evaluation of accelerated aging of commercial drivers on model of biological age based on parameters of physical work ability // *Adv. Gerontol.* 2013. Vol. 3. N 3. P. 236–242.
7. *Shin K.E., Putnam R.H.* Age and academic-professional honors // *J. Gerontol.* 2002. Vol. 376. N 2. P. 220–229.
8. *Redelmeier D.A., Singh S.M.* Survival in Academy Award-winning actors and actresses // *Ann. Intern. Med.* 2001. Vol. 134. N 10. P. 955–962.
9. *Анисимов В.Н., Михальский А.И.* Стареет ли Нобелевский лауреат? Математический анализ возраста продолжительности жизни лауреатов Нобелевской премии за 1901–2003 гг. // *Усп. геронтол.* 2004. Т. 15. С. 14–22.
10. *Andreev E.M., Jdanov D., Shkolnikov V.M., Leon D.A.* Long term trends in the longevity of scientific elites: evidence from the British and the Russian Academies of Science // *Popul. Stud. (Camb.)*. 2011. Vol. 65. N 3. P. 319–334.
11. *Берёзкин В.Г., Буляница А.Л.* О некоторых демографических характеристиках членов Российской академии наук в XX в. // *Усп. геронтол.* 2007. Т. 20. № 1. С. 29–39.
12. *Anisimov V.N., Zharinov G.M.* Lifespan and longevity among representatives of creative professions // *Adv. Gerontol.* 2014. Vol. 4. N 2. P. 83–94.
13. *Zharinov G.M., Anisimov V.N.* Music and longevity // *Adv. Gerontol.* 2014. Vol. 4. N 4. P. 283–289.
14. *Жаринов Г.М., Анисимов В.Н.* Продолжительность жизни, долгожительство и некоторые причины смерти у литераторов разных жанров // *Усп. геронтол.* 2016. Т. 29. № 2. С. 210–217.
15. Большая советская энциклопедия: [в 30 т.] / Гл. ред. А.М. Прохоров. 3-е изд. М.: Советская энциклопедия, 1969–1978.

16. Большая русская биографическая энциклопедия [Электронный ресурс] / ИДДК. М., 2005. 1 DVD.
17. *Gumbel E.J.* Statistics of extremes. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1958. 375 p.
18. *Mitteldorf J.* Social correlates of longevity — Part II. [Электронный ресурс]. 2012. URL: <http://joshmitteldorf.scienceblog.com> (дата обращения: 11.07.2016).
19. *Анисимов В.Н., Жаринов Г.М.* Продолжительность жизни учёных различных специальностей // Природа. 2014. № 5. С. 51–52.
20. *Steen G., Berg S., Steen B.* Cognitive function in 70-year-old men and women. A 16-year cohort difference population study // Aging Clin. Exp. Res. 1998. Vol. 10. N 2. P. 120–126.
21. *Kaplan R.M., Howard V.J., Safford M.M., Howard G.* Educational attainment and longevity: results from the REGARDS U.S. national cohort study of blacks and whites // Ann. Epidemiol. 2015. Vol. 25. N 5. P. 323–328.
22. *Маньковский Н.Б., Миц А.Я., Кузнецова С.М., Белоног Р.П.* Долгожители: Нейрофизиологические аспекты. Л.: Наука, 1985. 160 с.
23. *Kanazawa S.* IQ and the health of states // Biodemography Soc. Biol. 2008. Vol. 54. N 2. P. 200–213.
24. *Lager A., Bremberg S., Vågerö D.* The association of early IQ and education with mortality: 65 year longitudinal study in Malmö, Sweden // Brit. Med. J. 2009. Vol. 339. b5282.
25. *Willcox B.J., Willcox D.C., He Q., Carb D.J., Suzuki M.* Siblings of Okinawan centenarians share lifelong mortality advantages // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2006. Vol. 61. N 4. P. 345–354.
26. *Adler N., Pantell M.S., O'Donovan A., Blackburn E., Cawthon R., Koster A., Opreshko P., Newman A., Harris T.B., Epel E.* Educational attainment and late life telomere length in the Health, Aging and Body Composition Study // Brain Behav. Immunol. 2013. Vol. 27. N 1. P. 15–21.
27. *Robertson T., Batty G.D., Der G., Fenton K., Shiels P.G., Benzeval M.* Is socioeconomic status associated with biological aging as measured by telomere length? // Epidemiol. Rev. 2013. Vol. 35. N 1. P. 98–111.
28. *Stepoe A., Hamer M., Butcher L., Brydon L., Kivimäki M., Marmot M., Blackburn E., Erusalimsky J.D.* Educational attainment but not measures of current socioeconomic circumstances are associated with leukocyte telomere length in healthy older men and –women // Brain Behav. Immun. 2011. Vol. 25. N 7. P. 1292–1298.
29. *Jaffe K., Lindquist K., Kluse M., Cawthon R., Harris T., Hsueh W. C., Simonsick E. M., Kuller L., Li R., Ayonayon H.N., Rubin S. M., Cummings S.R.* Telomere length and cognitive function in community dwelling elders: findings from the Health ABC Study // Neurobiol. Aging. 2011. Vol. 32. N 11. P. 2055–2060.
30. *Coates W.C.* Being a mentor: what's in it for me? // Acad. Emerg. Med. 2012. Vol. 19. N 1. P. 92–97.
31. *Sri Kantha S.* Centenarian scientists: an unusual cluster newly formed in the 20th century // Med. Hypothes. 2001. Vol. 57. N 6. P. 750–753.
32. *Franceschi C., Motta L., Motta M., Motta M., Candore G., Caruso C.* The extreme longevity: The state of the art in Italy // Exp. Geront. 2008. Vol. 43. N 2. P. 45.
33. *Шмидт П.Ю.* Борьба со старостью. Петроград: Изд-во П.П. Сойкина, 1915. 32 с.
34. *Анисимов В.Н.* Борьба со старостью: надежда на разум // Природа. 2012. № 1. С. 88–95.

Поступила в редакцию 10.08.2016

Принята в печать 09.09.2016

GERONTOLOGY

MEAN AGE OF DEATH AND LONGEVITY OF MALE SCHOLARS
OF DIFFERENT SPECIALTIESV.N. Anisimov^{1,2,*}, G.M. Zharinov³¹ Department of Carcinogenesis and Oncogerontology, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Leningradskaya ul. 68, Pesochny, St. Petersburg, 197758, Russia;² Department of Geriatrics and Organization of Gerontological Assistance, Peoples' Friendship University of Russia, Miklukho-Maklaya ul. 6, Moscow, 117198, Russia;
³ Russian Scientific Center of Radiology and Surgery Technologies, Leningradskaya ul. 70, Pesochny, St. Petersburg, 197758; Russia

*e-mail: aging@mail.ru

The article provides information on the mean age of death (MAD) of 54256 men engaged professionally in research work and assigned to one of six categories: physics, chemistry, mathematics, economics, medicine and biology, humanities. In addition, the effect of teaching activity of scientists of different specialties on MAD and longevity was evaluated. Special attention has been paid to the analysis of MAD for members of the Russian Academy of Sciences, including members of the Academy of Sciences of the USSR (1924–2013). The minimum MAD was found for scientists involved in mathematics (72.1 ± 0.21 years) and the maximum MAD — for economists (74.6 ± 0.26 years). The relative numbers of surviving ≥ 90 years and ≥ 100 years were minimal for mathematicians (7.59% and 0.37%, respectively), while economists had the maximum values of these parameters (10.26% and 0.96%, respectively). Indicators of MAD and the proportion of centenarians among the scientists, who received public recognition, strongly depended on the specialty. Among the members of the Russian Academy of Sciences, the highest MAD also belonged to economists (74.7 ± 1.05 years) and the lowest — to mathematicians (70.6 ± 0.74 years). MAD was 3.5 years higher for scientists involved in teaching in university or college in comparison with those who were not involved in the teaching activities. In this case,

the “gain” was very high, ranging from 3.1 years for economists to 4.9 years for mathematicians. The results of the study allow to conclude that intensive scientific work contributes to an increase in life expectancy and longevity.

Keywords: *mean age of death, longevity, scientists, teachers, members of the Russian Academy of Sciences.*

Сведения об авторах

Анисимов Владимир Николаевич — член-корр. РАН, докт. мед. наук, проф., заведующий научным отделом канцерогенеза и онкогеронтологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, Минздрава РФ. Тел.: 8-812-439-9534, e-mail: aging@mail.ru

Жаринов Геннадий Михайлович — докт. мед. наук, проф., руководитель отделения лучевой терапии Российского научного центра радиологии и хирургических технологий Минздрава РФ. Тел.: 8-901-316-90-68; e-mail: asatur15@mail.ru

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 575.13:577.24 612.68.001.5"56"

ТРАНСГЕНЕРАЦИОННОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ:
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ И ЭМПИРИЧЕСКИЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА

О.Г. Забуга, А.М. Вайсерман*

ГУ "Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева" НАМНУ; Украина, 04114, г. Киев, ул. Вышгородская, д. 67;

*e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

В ряде экспериментальных и эпидемиологических исследований получены доказательства того, что здоровье и темп старения организма могут в значительной степени зависеть от условий, в которых проходит его раннее развитие. В работах последних лет получены данные, свидетельствующие о том, что эффекты, являющиеся последствием стрессов в раннем онтогенезе, могут наследоваться трансгенерационно, обуславливая изменения различных характеристик в последующих поколениях. Показано, что ключевую роль в реализации подобных трансгенерационных эффектов могут играть эпигенетические факторы, связанные с регуляцией генетической экспрессии, в том числе метилирование ДНК, модификации гистонов хроматина и микроРНК. До последнего времени считалось общепринятым, что в ходе гаметогенеза и эмбриогенеза происходит полное стирание эпигенетических меток. В последние годы, однако, в ряде работ получены данные, свидетельствующие о том, что в некоторых случаях эпигенетические модификации, индуцированные на протяжении жизни организма, могут стираться не полностью и передаваться его потомкам, влияя на их фенотипические проявления в ряду поколений. В обзоре приведены данные эпидемиологических и экспериментальных исследований, свидетельствующих о возможности трансгенерационного наследования продолжительности жизни и ассоциированных с долгожительством признаков.

Ключевые слова: продолжительность жизни, эпигенетика, регуляция генетической экспрессии, программирование в период развития, трансгенерационное наследование, обзор.

Биологические механизмы, определяющие темп старения и продолжительность жизни (ПЖ) человека, в последние годы являются предметом активного изучения. Традиционно геронтологические исследования в основном посвящены изучению образа жизни взрослого организма как основного фактора, определяющего скорость старения и долголетность. Тем не менее, полученные на протяжении двух последних десятилетий данные экспериментальных, эпидемиологических и клинических исследований свидетельствуют о том, что склонность к определенным возрастным хроническим заболеваниям может быть "запрограммирована" ещё на начальных этапах жизни организма [1–3]. Это связано с тем, что период развития всех живых существ характеризуется высокой степенью пластичности, обеспечивающей возможность формирования различных фенотипов на основе одного и того же генотипа в зависимости от условий окружающей среды на ранних стадиях онтогенеза. В большом количестве эпидемиологических исследований выявлено, что риск возникновения различных хронических заболеваний позднего возраста (в том числе метаболических и сердечно-сосудистых патологий, а также рака) в значительной степени может зависеть от особенностей питания матери, курения и инфекций во время беременности и в первые месяцы после рождения ребенка [3]. По-

казано, что неблагоприятные воздействия различных факторов окружающей среды могут модулировать профили экспрессии многих генов, влияя тем самым на рост и развитие плода [2, 3]. Такие изменения транскрипционной активности генов могут устойчиво воспроизводиться в ряду клеточных поколений, долговременно влияя на фенотип и, в том случае, если условия последующей жизни организма совпадают с условиями, в которых проходило его раннее развитие, способствуют его адаптации и повышают шансы на выживание. В том же случае, если между условиями, в которых проходит раннее развитие организма, и теми, в которых он оказывается в последующей жизни, существует несоответствие, это может впоследствии привести к возникновению хронических заболеваний и сокращению жизни [2]. На основе этих предположений была сформулирована гипотеза "онтогенетического программирования" хронических заболеваний (Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis). В последние годы получены доказательства того, что от условий раннего развития может зависеть не только склонность к возрастным патологиям, но и темп старения как таковой и даже ПЖ [4].

В соответствии с доминирующей в научной среде точкой зрения, наиболее вероятной причиной онтогенетического программирования болезней взрослой жизни являются процессы, происходящие

на уровне эпигенетической регуляции активности генов. Эпигенетика может быть определена как изучение митотически и/или мейотически наследуемых изменений экспрессии генов, которые не являются следствием изменений в последовательности нуклеотидов, входящих в состав ДНК [5]. Основные известные на сегодняшний день эпигенетические механизмы включают в себя метилирование ДНК, модификации гистонов и регуляцию на уровне микроРНК [1–3]. У млекопитающих эпигенетические метки устанавливаются на ранних стадиях развития и остаются относительно неизменными в течение онтогенеза [6]. Однако имеются доказательства того, что эпигенетические модификации могут происходить на протяжении всего жизненного цикла индивида. Так, выявлено, что в процессе старения происходит тотальное деметилирование ДНК в различных тканях позвоночных [7]. Предполагается, что эти процессы могут приводить к увеличению нестабильности генома с возрастом [7, 8]. Доказательства возрастных эпигенетических изменений были продемонстрированы в исследованиях, осуществленных на монозиготных близнецах. В этих работах показано, что различия в эпигенетических характеристиках близнецов, включая метилирование ДНК и ацетилирование гистонов, увеличиваются с возрастом. На основе этих данных сформулирована концепция ассоциированного с возрастом “эпигенетического дрейфа” (age-associated epigenetic drift), который может возникать не случайно, а соответственно влиянию определенных средовых факторов на определенных этапах онтогенеза [9].

За последние два десятилетия получены доказательства того, что индуцированные теми или иными факторами окружающей среды эффекты, связанные с онтогенетическим программированием, могут сохраняться и трансгенерационно (т.е. в ряду последующих поколений). В рамках традиционных представлений подобные эффекты принято объяснять либо индукцией изменений на генетическом уровне, либо долговременным сохранением тех же неблагоприятных условий, которые изначально привели к их возникновению. Тем не менее, получено много данных, демонстрирующих, что к возникновению таких долговременно сохраняющихся эффектов могут приводить индуцированные теми или иными стрессами изменения на уровне эпигенетической регуляции активности генов, передающиеся от предков потомкам [10, 11]. Такой тип наследования в современной научной литературе принято называть “мягким наследованием” (soft inheritance) в отличие от “жесткого наследования” (hard inheritance) посредством генетического материала, остающегося неизменным на протяжении поколений, за исключением случаев стохастически возникающих мутаций [12]. Многие авторы считают роль “мягкого наследования” в процессах, происходящих на уровне популяций разных видов, несущественной. Появляется, однако, все больше

доказательств того, что этот тип наследования широко распространен и может оказывать существенное влияние на различные биологические процессы — от адаптации на индивидуальном уровне до эволюционных процессов на уровне популяций [6, 13]. В частности, во многих экспериментах, осуществленных на грызунах, морских свинках и овцах, выявлено, что количественные и качественные характеристики питания самок во время беременности и лактации могут влиять на обмен веществ и темп старения их потомков на протяжении нескольких поколений [14]. Необходимо, однако, отметить, что, в то время как онтогенетическое программирование заболеваний взрослого возраста описано во многих научных публикациях, эффекты трансгенерационного программирования особенностей старения и ПЖ до сих пор зафиксированы только в немногих работах. Целью этого краткого обзора является описание концептуального базиса, а также экспериментальных и эпидемиологических исследований, результаты которых свидетельствуют о том, что условия ранней жизни могут программировать состояние здоровья и ПЖ взрослых особей не только в поколении, непосредственно подвергшемся воздействию определенных факторов окружающей среды, но и в последующих генерациях.

Трансгенерационное программирование продолжительности жизни и ассоциированных с долгожительством признаков: эпидемиологические и демографические доказательства

В ряде эпидемиологических и демографических исследований, касающихся популяций разных стран, получены данные, свидетельствующие о возможности трансгенерационной передачи эффектов, индуцированных стрессами в раннем онтогенезе родительского поколения. Так, выявлено, что потомки женщин, которые подверглись воздействию голода 1944–1945 гг. в Голландии (“Dutch Hunger Winter”) во время своего внутриутробного развития, в 1,8 раз чаще имели проблемы со здоровьем в дальнейшей жизни, чем потомки женщин, не подвергшихся голоданию [15]. Впоследствии Винендал с соавт. показали, что потомки внутриутробно пострадавших от недоедания отцов (но не матерей) имели во взрослом возрасте существенно больший вес и индекс массы тела, чем потомки родителей, которые не пострадали от голода [16]. При изучении долговременных последствий голода в Китае в 1959–1961 гг. (“Great China Famine”) выявлено, что потомки родителей, родившихся во время голода, были существенно ниже (мальчики на 1,89 см и девочки на 1,78 см), чем дети родителей, не подвергшихся голоду в период их раннего развития [17]. По мнению авторов, это могло негативно повлиять на статус их здоровья как в детстве, так и во взрослом возрасте. Подтверждения возможности передачи подобных эффектов в ряду поколения получены и при исследовании младенцев, внутри-

утробное развитие матерей которых пришлось на период поста во время Рамадана. Такие младенцы имели меньший рост и вес, а также меньший размер плаценты (что может приводить к повышенному риску возникновения кардио-метаболических патологий во взрослом возрасте), чем те, внутриутробное развитие матерей которых происходило в другое время [18]. В некоторых работах также получены подтверждения того, что возникновение эпигенетических модификаций в родительских и прародительских поколениях может в значительной степени влиять на риск семейного рака различных локализаций [19].

Данные ряда исследований свидетельствуют о том, что эффекты, связанные с онтогенетическим программированием, могут также влиять на возраст-зависимую смертность и ПЖ людей. В цикле работ, осуществленных на когортах, родившихся в 1890, 1905 и 1920 гг. в округе Оверкаликс (Overkalix) на территории северной Швеции, обнаружено, что питание людей на протяжении препубертатного периода развития (9–12 лет) может в значительной степени влиять на уровень смертности и ПЖ их внуков [20–23]. Оказалось, что долговечность потомков зависит от качества питания их предков (дедушек и бабушек) на протяжении периода медленного роста, предшествующего периоду быстрого увеличения скорости роста во время пубертата. Было также установлено, что переедание людей на протяжении этого возрастного периода может уменьшить ПЖ их внуков. Кроме того, продемонстрировано, что умеренное питание отца и умеренно обильное питание матери ассоциировано со сниженным риском смерти от сердечно-сосудистой патологии у их потомков. Более того, уровень смертности вследствие диабета был увеличен в 4 раза, если дед по отцовской линии получал неограниченное количество пищи в течение периода медленного роста [20]. Позднее была выявлена трансгенерационная связь между качеством и количеством питания в начале жизни бабушки и дедушки по отцовской линии и ПЖ внуков, что проявлялось, прежде всего, в увеличении риска смерти от сердечно-сосудистых заболеваний и диабета у людей, чьи бабушки и дедушки переедали во время медленного роста [22–24]. Эта связь имела гендерные особенности: характеристики питания бабушек по отцовской линии влияли на риск смертности у внуков, а дедушек по отцовской линии — у внуков [22, 23]. В недавней работе той же исследовательской группы продемонстрировано, что резкие изменения (от одного года к другому) характеристик питания во время медленного роста обоих предков по материнской линии, а также дедушек по отцовской линии не влияют на смертность их потомков [25]. Если же подобные изменения питания претерпевали перед половым созреванием бабушки по отцовской линии, их внуки имели существенно повышенный риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний. По мнению

авторов, эти эффекты вряд ли могут объясняться особенностями образа жизни или селективными (генетическими) процессами. Наиболее вероятным объяснением, по их мнению, является перенос определенной информации посредством эпигенетических меток, сохраняющихся на X-хромосоме сперматозоида в процессе мейоза [25], а также передачи этой информации при помощи некодирующих микроРНК [26].

В исследовании, осуществленном в Швеции, в качестве “индикатора” неблагоприятных условий развития использовалась незаконнорожденность, по очевидным причинам связанная с более низким социально-экономическим уровнем жизни, чем в случае рождения в полных семьях. В этой работе выявлено, что уровень смертности мужчин и женщин, рожденных вне брака в начале двадцатого века, был во взрослом возрасте существенно выше, чем у людей, рожденных в законном браке [27]. У мужчин из этой группы также было меньше шансов дожить до 80 лет по сравнению с теми, кто был рожден в браке. Подобные тенденции были также свойственны их детям и внукам.

Получены также доказательства того, что к трансгенерационным эффектам, влияющим на здоровье человека, может приводить и воздействие факторов, не имеющих прямого отношения к питанию, в частности, наличие токсинов в окружающей среде во время развития ребенка. Подобные данные получены в отношении диэтилstilбестрола — синтетического нестероидного эстрогена, который был использован в период между 1938 и 1971 гг. для предотвращения выкидышей и других осложнений беременности, но применение которого, как оказалось, приводит к серьезным побочным эффектам, и поэтому было запрещено в США и других странах. Было выявлено, что женщины, бабушки которых по материнской линии принимали во время ранней беременности диэтилstilбестрол, имеют повышенный риск развития рака яичников [28]. К трансгенерационным эффектам в отношении здоровья людей может приводить и воздействие никотина. В уже упоминавшемся ранее исследовании установили, что курение жителей шведского округа Оверкаликс в период препубертата привело к увеличению индекса массы тела их детей в 9-летнем возрасте [22]. Этот эффект, однако, проявлялся только у мальчиков; у девочек он выражен не был. В работе Нортстона с соавт. [29] было показано, что курение мальчиков на протяжении этого периода развития также приводит к повышению риска ожирения их сыновей в подростковом возрасте.

Результаты эпидемиологических исследований, свидетельствующие о возможности трансгенерационных эффектов, связанных с онтогенетическим программированием характеристик здоровья и возраст-зависимой смертности людей, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Данные исследований, демонстрирующих влияние на здоровье и продолжительность жизни людей трансгенерационных программирующих эффектов неблагоприятных условий в ранней жизни

Ситуация (условие, фактор)	Стадия онтогенеза	Поклоение	Последствия для здоровья	Источник
Голод в Голландии 1944–1945 гг.	Внутриутробное развитие	F2	Плохое состояние здоровья в дальнейшей жизни	[15]
Недостаточное питание	Пренатальное развитие	F1	Ожирение	[16]
Переедание	Период медленного роста	F2	Ухудшение выживаемости	[18]
Недоедание	Период медленного роста	F2	Увеличение уровня смертности	[22]
Переедание	Период медленного роста	F2	Высокий уровень преждевременной смерти	[23]
Резкие изменения характеристик питания	Период медленного роста	F1	Повышенный уровень смертности от сердечно-сосудистых заболеваний	[25]
Незаконнорождённость	Детство	F0-F2	Повышенный риск смертности во взрослом возрасте	[27]
Приём диэтилstilбестрола	Ранняя беременность	F2	Повышенный риск развития рака яичников	[28]
Курение	Период медленного роста	F1	Повышение индекса массы тела	[22]
Курение	Период медленного роста	F1	Ожирение в подростковом возрасте	[29]

Изучение эпигенетических механизмов трансгенерационного наследования в экспериментальных исследованиях

Одной из основных особенностей трансгенерационного (эпигенетического) наследования является то, что, как правило, выраженность этих эффектов постепенно уменьшается и сходит на нет в течение 3–4 поколений [30]. Известно, что при переходе от одного поколения к другому происходит очищение от накопленной в течение прошедшего отрезка жизни эпигенетической информации. Например, у млекопитающих на стадиях позднего гаметогенеза и имплантации бластоцисты происходит практически полное деметилирование генома с последующим метилированием *de novo* [31]. Однако в последние годы накапливается все больше свидетельств того, что некоторые эпигенетические метки могут сохраняться в ходе этих “волн деметилирования/метилирования” и воспроизводиться у потомков на протяжении нескольких последующих поколений [10–13]. Некоторые авторы высказывают предположение, что подобный вид наследования может иметь адаптивное значение и позволяет популяциям быстрее приспосабливаться в случае резких изменений условий их обитания [32]. В качестве наиболее вероятных механизмов, обуславливающих трансгенерационное эпигенетическое наследование, рассматриваются изменения

на уровне метилирования ДНК, модификации гистонов, воздействие определенных факторов, локализованных в цитоплазме (прежде всего, малых регуляторных РНК) [32], а также прионов [33].

В последующих разделах будут описаны результаты исследований, посвященных изучению механизмов, определяющих трансгенерационное наследование ПЖ и ассоциированных с долгожительством признаков, на различных модельных объектах.

Нематода

Возможность трансгенерационного эпигенетического наследования ПЖ у нематоды *Caenorhabditis elegans* продемонстрирована в статье Гриа и соавт., опубликованной в 2011 г. в журнале Nature [34]. В этой работе показано, что некоторые модификации гистонов, а именно — изменения в комплексе H3K4me3 в родительском поколении, могут влиять на ПЖ последующих поколений нематод. Авторы скрещивали долгоживущих мутантных самок, носителей модифицированного комплекса H3K4me3, с самцами дикого типа для получения гетерозиготных потомков F1. Потомки поколения F2 были получены в результате самооплодотворения гетерозиготных червей F1, что дало возможность в результате расщепления потомков выделить как гетерозиготных нематод, так и гомозиготных му-

тантов или особей дикого типа. Поколения F3–F5 были созданы аналогичным образом. Неожиданно было выявлено, что потомкам этих скрещиваний в поколениях F2–F4, генетически принадлежащим к дикому типу, был присущ “долгоживущий” фенотип, сходный с таковым у их мутантных предков. Полногеномное профилирование транскриптома червей показало, что долгоживущие мутанты и представители дикого типа F2–F4, произошедшие от них, демонстрируют сходный уровень транскрипционной активности многих генов. Этот эффект сходил на нет только в поколении F5, в котором была восстановлена нормальная для нематод ПЖ. Позже в своем аналитическом обзоре Лим и Бруне [35] высказали предположение, что эффекты, подобные тем, которые наблюдались в этом исследовании, с наибольшей вероятностью можно объяснить влиянием микроРНК или специфических транскрипционных факторов, от которых зависит уровень экспрессии ассоциированных с ПЖ генов, хотя нельзя исключать и воздействие других факторов, например, прионов.

Плодовая мушка

Трансгенерационные эффекты в отношении ПЖ выявлены в недавнем исследовании, осуществленном на плодовой мушке *Drosophila melanogaster* [36]. В этой работе мушек после вылупления из куколок содержали на пищевой смеси с различным соотношением белков и углеводов. Диета как с пониженным содержанием белка, так и с существенно повышенным, уменьшала ПЖ потомков. В то же время, содержание на корме с умеренно увеличенным содержанием белка приводило к значительному увеличению ПЖ мушек, причем этот эффект сохранялся в поколениях F1–F3. Подобные трансгенерационные эффекты были выявлены и в отношении репродуктивной активности насекомых. Данкан с соавт. в своем недавнем исследовании изучили механизмы, предположительно влияющие на процессы трансгенерационного наследования у *Drosophila* [37]. Они показали, что разведение самок на пищевой смеси с высоким содержанием сахара приводит к существенному изменению состава тела личинок их потомков, а также к увеличению проявлений ожирения и модификации экспрессии генов, играющих важную роль в контроле метаболических процессов, на протяжении последующих двух поколений.

Лучепёрая аквариумная рыбка

В исследовании Ломбо с соавт. [38] объектом исследования была лучепёрая аквариумная рыбка (*Zebrafish*). Взрослые самцы на протяжении периода сперматогенеза были подвергнуты действию бисфенола А (BPA), а затем скрещены с интактными самками. Потомки этих скрещиваний в поколениях F1 и F2 характеризовались выраженным увеличе-

нием частоты патологий сердца. Также в поколении F1 выявлено существенное снижение транскрипционной активности пяти генов, играющих важную роль в развитии сердца у рыбок. Также в поколениях F0 и F1 в сперме самцов был понижен уровень экспрессии генов, принимающих участие в раннем развитии. В частности, у этих рыбок был существенно изменен инсулиновый сигналинг (как известно, играющий важную роль в процессах, определяющих потенциал долгожительства [39]) за счет снижения экспрессии бета-субъединицы инсулинового рецептора.

Мускусная утка

Трансгенерационные эффекты в отношении метаболических показателей, в значительной степени влияющих на ПЖ, выявлены и у птиц. В недавнем исследовании, реализованном на мускусной утке (*Muscovy duck*), было изучено влияние на потомков дефицита метионина, играющего, как известно, ключевую роль в процессе метилирования ДНК [8]. Показано, что дефицит этого компонента в пище самок может влиять на фенотипические проявления у их потомков в поколении F2. В частности, это привело к уменьшению массы тела птиц, увеличению у них уровня глюкозы и триглицеридов в плазме крови [40].

Грызуны

Экспериментальные доказательства, свидетельствующие о возможности трансгенерационного эпигенетического наследования характеристик, в значительной мере ассоциированных с долгожительством, получены и в исследованиях, осуществленных на грызунах. Потомки самцов мышей, содержащихся на корме с низким содержанием белка, характеризовались увеличенным уровнем экспрессии многих генов, вовлеченных в синтез липидов и холестерина, в сравнении с потомками контрольных животных. Измененными также оказались и характеристики метилирования многих генов, в том числе ключевого регулятора липидного обмена *Ppara* [41]. В другом исследовании индукция предиабетического состояния у самцов мышей привела к увеличению риска развития диабета у их потомков [42]. Эти эффекты сопровождалась модуляцией уровня экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм глюкозы и инсулиновый сигналинг, в бета-клетках поджелудочной железы, а также изменениями характеристик метилирования этих генов. Кроме того, у потомков мышей с предиабетом были в значительной степени трансформированы характеристики метилома спермы, и эти изменения в значительной степени совпадали с модификациями, выявленными в бета-клетках. В исследовании Котурбаша с соавт. [43] выявлено глобальное снижение метилирования генома, а также накопление разрывов ДНК в клетках тимуса у потомков

облученных мышей. По мнению авторов, такие изменения могут свидетельствовать о дестабилизации генома и увеличении в ряду поколений риска возникновения новообразований у потомков облученных животных.

Экспериментальные подтверждения возможности трансгенерационного наследования характеристик, ассоциированных с долгожительством, получены также в исследованиях, осуществленных на крысах. Так, было выявлено, что воздействие винклозолина (фунгицида, обладающего антиандрогенной активностью) на протяжении критического периода эмбрионального развития увеличивает риск серьезных нарушений во взрослом возрасте, включая бесплодие, образование опухолей, болезни почек и нарушения иммунитета, не только у особей, непосредственно подвергнутых воздействию винклозолина, но и у их потомков в течение четырех поколений [44]. Эти эффекты сопровождалась отклонениями характеристик метилирования ДНК различных генов в сперме, сохраняющимися в течение нескольких поколений. В более позднем исследовании у потомков (F3) животных, подвергнутых воздействию винклозолина, с помощью полногеномного анализа метилирования ДНК спермы также было выявлено 16 генов с выраженными изменениями параметров метилирования ДНК [45]. К подобным трансгенерационным эффектам в отношении склонности к заболеваниям

взрослого возраста у крыс, сопровождавшимся эпигенетическими изменениями на уровне метилирования ДНК спермы, привело и пренатальное воздействие других токсических соединений — диоксина [46], эндокринных дизрапторов, использующихся при изготовлении пластмасс, в том числе бисфенола А (BPA), диэтилгексилфталата (DEHP) и дибутилфталата (DBP) [47], а также пестицида метоксихлора [48]. В более позднем исследовании этого же коллектива авторов воздействие инсектицида дихлордифенилтрихлорметана (ДДТ) на беременных самок привело к возникновению ожирения и ассоциированных с ним заболеваний более чем у 50% их потомков (как самцов, так и самок) в поколении F3. Авторы также выявили в этом поколении изменения характеристик метилирования ДНК генов, имеющих отношение к развитию ожирения и метаболического синдрома [49]. Результаты исследований, демонстрирующих трансгенерационные программирующие эффекты в отношении ПЖ и ассоциированных с долгожительством признаков у экспериментальных животных, представлены в табл. 2.

К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных и эпидемиологических данных, свидетельствующих о возможности трансгенерационного сохранения эпигенетических модификаций, индуцированных стрессовыми воздействиями пищевой и иной природы во время

Таблица 2

Данные исследований, демонстрирующих трансгенерационные программирующие эффекты в отношении продолжительности жизни и ассоциированных с долгожительством признаков у экспериментальных животных

Модельный организм	Ситуация (условие, фактор)	Поколение	Последствия для здоровья	Источник
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Мутация	F2–F4	Увеличенная ПЖ	[34]
<i>Drosophila melanogaster</i>	Сниженное отношение “белки/углеводы” в пищевой смеси	F1–F3	Уменьшенная ПЖ	[36]
	Умеренно увеличенное отношение “белки/углеводы” в пищевой смеси	F1–F3	Увеличенная ПЖ	
<i>Drosophila melanogaster</i>	Повышенное содержание сахара в пищевой смеси самок	F2–F3	Ожирение, метаболические нарушения	[37]
<i>Zebrafish</i>	Воздействие бисфенола А	F1–F2	Увеличение уровня патологий сердца	[38]
<i>Muscovy duck</i>	Дефицит метионина в корме самок	F2	Уменьшение массы тела и увеличение уровня глюкозы и триглицеридов в плазме крови	[40]
Мышь	Сниженное содержание белка в корме самцов	F1	Нарушенный синтез липидов и холестерина	[41]
Мышь	Индукция предиабета у самцов	F1	Диабет; нарушения метаболизма глюкозы и инсулинового сигналинга	[42]
Мышь	Рентгеновское облучение	F1	Дестабилизация генома в клетках тимуса	[43]
Крыса	Воздействие винклозолина в пренатальный период	F2–F5	Бесплодие, опухоли, болезни почек, нарушения иммунитета	[44]
Крыса	Воздействие ДДТ в пренатальный период	F3	Ожирение и ассоциированные с ним заболевания	[49]

раннего развития организма. От этих процессов, в частности, могут зависеть склонность к возрастным патологиям, а также особенности старения и ПЖ организма [10–14]. В то же время значимость этих процессов для детерминации темпа старения в сопоставлении со значимостью традиционно рассматриваемых генетических факторов и условий средового окружения остается неизвестной. Для того чтобы определить потенциальное значение мягкого (эпигенетического) наследования в детерминации темпа старения и потенциала долголетия, в работах будущих лет предстоит ответить на некоторые вопросы, важные для понимания роли негенетического наследования. Некоторые из этих вопросов представлены ниже. Большинство из них рассматривались неоднократно, но до сегодняшнего дня ответы были получены лишь частично, поэтому эти вопросы до сих пор являются предметом оживленных дискуссий.

– Насколько распространено транскгенерационное эпигенетическое наследование?

– Какова относительная важность “мягкого” (негенетического) наследования по сравнению с “жестким” (генетическим)?

– На протяжении скольких поколений могут воспроизводиться транскгенерационные эффекты?

– Почему транскгенерационные эффекты сходят на нет через несколько поколений?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Padmanabhan V., Cardoso R.C., Puttabyatappa M. Developmental programming, a pathway to disease // *Endocrinology*. 2016. Vol. 157. N 4. P. 1328–1340.
2. Bateson P., Gluckman P., Hanson M. The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis // *J. Physiol.* 2014. Vol. 592. N 11. P. 2357–2368.
3. Vaiserman A. Epidemiologic evidence for association between adverse environmental exposures in early life and epigenetic variation: a potential link to disease susceptibility? // *Clin. Epigenetics*. 2015. Vol. 7. N 1. P. 96.
4. Vaiserman A.M. Early-life nutritional programming of longevity // *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2014. Vol. 5. N 5. 325–338.
5. Berger S.L., Kouzarides T., Shiekhattar R., Shilatifard A. An operational definition of epigenetics // *Genes Dev.* 2009. Vol. 23. N 7. P. 781–783.
6. van Otterdijk S.D., Michels K.B. Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence? // *FASEB J.* 2016. Vol. 30. N 7. P. 2457–2465.
7. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F. Aging epigenetics: accumulation of errors or realization of a specific program? // *Biochemistry (Mosc.)*. 2015. Vol. 80. N 11. P. 1406–1417.
8. Johnson A.A., Akman K., Calimport S.R., Wuttke D., Stolzing A., de Magalhães J.P. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease // *Rejuvenation Res.* 2012. Vol. 15. N 5. P. 483–494.
9. Zheng S.C., Widschwendter M., Teschendorff A.E. Epigenetic drift, epigenetic clocks and cancer risk // *Epigenomics*. 2016. Vol. 8. N 5. P. 705–719.
10. Blake G.E., Watson E.D. Unravelling the complex mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016. Vol. 33. P. 101–107.
11. Rando O.J. Intergenerational transfer of epigenetic information in sperm // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. Vol. 6. N 5. a022988.
12. Hanson M.A., Low F.M., Gluckman P.D. Epigenetic epidemiology: the rebirth of soft inheritance // *Ann. Nutr. Metab.* 2011. Vol. 58. Suppl. 2. P. 8–15.
13. Grossniklaus U., Kelly B., Ferguson-Smith A.C., Pembrey M., Lindquist S. Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? // *Nat. Rev. Genet.* 2013. Vol. 14. N 3. P. 228–235.
14. Aiken C.E., Tarry-Adkins J.L., Ozanne S.E. Transgenerational effects of maternal diet on metabolic and reproductive ageing // *Mamm. Genome*. 2016. Vol. 27. N 7–8. P. 430–439.
15. Painter R.C., Osmond C., Gluckman P., Hanson M., Phillips D.I.W., Roseboom T.J. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life // *BJOG*. 2008. Vol. 115. N 10. P. 1243–1249.
16. Veenendaal M.V., Painter R.C., de Rooij S.R., Bosuys P.M., van der Post J.A., Gluckman P.D., Hanson M.A., Roseboom T.J. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944–45 Dutch famine // *BJOG*. 2013. Vol. 120. N 5. P. 548–553.
17. Li Q., An L. Intergenerational health consequences of the 1959–1961 Great Famine on children in rural China // *Econ. Hum. Biol.* 2015. Vol. 18. P. 27–40.
18. Alwasel S.H., Harrath A., Aljarallah J.S., Abotalib Z., Osmond C., Al Omar S.Y., Khaled I., Barker D.J. Intergenerational effects of *in utero* exposure to Ramadan in Tunisia // *Am. J. Hum. Biol.* 2013. Vol. 25. N 3. P. 341–343.
19. Fleming J.L., Huang T.H., Toland A.E. The role of parental and grandparental epigenetic alterations in familial cancer risk // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68. N 22. P. 9116–9121.

20. Bygren L.O., Kaati G., Edvinsson S. Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period // *Acta Biotheor.* 2001. Vol. 49. N 1. P. 53–59.
21. Kaati G., Bygren L.O., Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period // *Eur. J. Hum. Genet.* 2002. Vol. 10. N 11. P. 682–688.
22. Pembrey M.E. et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans // *Eur. J. Hum. Genet.* 2006. Vol. 14. N 2. P. 159–166.
23. Kaati G., Bygren L.O., Pembrey M., Sjöström M. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity // *Eur. J. Hum. Genet.* 2007. Vol. 15. N 7. P. 784–790.
24. Pembrey M.E. Male-line transgenerational responses in humans // *Hum. Fertil. (Camb.)*. 2010. Vol. 13. N 4. P. 268–271.
25. Bygren L.O., Tinghög P., Carstensen J., Edvinsson S., Kaati G., Pembrey M.E., Sjöström M. Change in paternal grandmothers' early food supply influenced cardiovascular mortality of the female grandchildren // *BMC Genet.* 2014. Vol. 15. P. 12.
26. Pembrey M., Saffery R., Bygren L.O.; *Network in Epigenetic Epidemiology*. Human transgenerational responses to early-life experience: potential impact on development, health and biomedical research // *J. Med. Genet.* 2014. Vol. 51. N 9. P. 563–572.
27. Modin B., Koupil I., Vågerö D. The impact of early twentieth century illegitimacy across three generations. Longevity and intergenerational health correlates // *Soc. Sci. Med.* 2009. Vol. 68. N 9. P. 1633–1640.
28. Titus-Ernstoff L., Troisi R., Hatch E.E., Hyer M., Wise L.A., Palmer J.R., Kaufman R., Adam E., Noller K., Herbst A.L., Strohsnitter W., Cole B.F., Hartge P., Hoover R.N. Offspring of women exposed *in utero* to diethylstilbestrol (DES): a preliminary report of benign and malignant pathology in the third generation // *Epidemiology*. 2008. Vol. 19. N 2. P. 251–257.
29. Northstone K., Golding J., Davey Smith G., Miller L.L., Pembrey M. Prepubertal start of father's smoking and increased body fat in his sons: further characterisation of paternal transgenerational responses // *Eur. J. Hum. Genet.* 2014. Vol. 22. N 12. P. 1382–1386.
30. Ho D.H., Burggren W.W. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective // *J. Exp. Biol.* 2010. Vol. 213. N 1. P. 3–16.
31. Hackett J.A., Surani M.A. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2013. Vol. 368. N 1609. P. 20110328.
32. Jablonka E. Epigenetic inheritance and plasticity: The responsive germline // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2013. Vol. 111. N 2–3. P. 99–107.
33. Halfmann R., Lindquist S. Epigenetics in the extreme: prions and the inheritance of environmentally acquired traits // *Science*. 2010. Vol. 330. N 6004. P. 629–632.
34. Greer E.L., Maures T.J., Ucar D., Hauswirth A.G., Mancini E., Lim J.P., Benayoun B.A., Shi Y., Brunet A. Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 2011. Vol. 479. N 7373. P. 365–373.
35. Lim J.P., Brunet A. Bridging the transgenerational gap with epigenetic memory // *Trends Genet.* 2013. Vol. 29. N 3. P. 176–186.
36. Xia B., de Belle J.S. Transgenerational programming of longevity and reproduction by post-eclosion dietary manipulation in *Drosophila* // *Aging (Albany NY)*. 2016. Vol. 8. N 5. P. 1115–1134.
37. Buescher J.L., Musselman L.P., Wilson C.A., Lang T., Keleher M., Baranski T.J., Duncan J.G. Evidence for transgenerational metabolic programming in *Drosophila* // *Dis. Model. Mech.* 2013. Vol. 6. N 5. P. 1123–1132.
38. Lombó M., Fernández-Díez C., González-Rojo S., Navarro C., Robles V., Herráez M.P. Transgenerational inheritance of heart disorders caused by paternal bisphenol A exposure // *Environ. Pollut.* 2015. Vol. 206. P. 667–678.
39. Avogaro A., de Kreutzenberg S.V., Fadini G.P. Insulin signaling and life span // *Pflugers Arch.* 2010. Vol. 459. N 2. P. 301–314.
40. Brun J.M., Bernadet M.D., Cornuez A., Leroux S., Bodin L., Basso B., Davail S., Jaglin M., Lessire M., Martin X., Sellier N., Morisson M., Pitel F. Influence of grand-mother diet on offspring performances through the male line in Muscovy duck // *BMC Genet.* 2015. Vol. 16. P. 145.
41. Carone B.R., Fauquier L., Habib N., Shea J.M., Hart C.E., Li R., Bock C., Li C., Gu H., Zamore P.D., Meissner A., Weng Z., Hofmann H.A., Friedman N., Rando O.J. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals // *Cell*. 2010. Vol. 143. N 7. P. 1084–1096.
42. Wei Y., Yang C.R., Wei Y.P., Zhao Z.A., Hou Y., Schatten H., Sun Q.Y. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2014. Vol. 111. N 5. P. 1873–1878.
43. Koturbash I., Baker M., Loree J., Kutanzi K., Hudson D., Pogribny I., Sedelnikova O., Bonner W., Kovalchuk O. Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006. Vol. 66. N 2. P. 327–330.
44. Anway M.D., Cupp A.S., Uzumcu M., Skinner M.K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility // *Science*. 2005. Vol. 308. N 5727. P. 1466–1469.
45. Guerrero-Bosagna C., Settles M., Lucker B., Skinner M.K. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome // *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5. N 9. e13100.
46. Manikkam M., Tracey R., Guerrero-Bosagna C., Skinner M.K. Dioxin (TCDD) induces epigenetic transgenerational inheritance of adult onset disease and sperm epimutations // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. N 9. e46249.
47. Manikkam M., Tracey R., Guerrero-Bosagna C., Skinner M.K. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease and sperm epimutations // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. N 1. e55387.
48. Manikkam M., Haque M.M., Guerrero-Bosagna C., Nilsson E.E., Skinner M.K. Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. N 7. e102091.
49. Skinner M.K., Manikkam M., Tracey R., Guerrero-Bosagna C., Haque M., Nilsson E.E. Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity // *BMC Med.* 2013. Vol. 11. P. 228.
50. Waldron D. Small RNAs: regulating transgenerational epigenetics // *Nat. Rev. Genet.* 2016. Vol. 17. N 6. P. 315.

Поступила в редакцию 08.08.2016

Принята в печать 02.09.2016

GERONTOLOGY

TRANSGENERATIONAL INHERITANCE OF LONGEVITY: THEORETICAL
FRAMEWORK AND EMPIRICAL EVIDENCE*O.G. Zabuga, A.M. Vaiserman***D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine,
Vyshgorodskaya ul. 67, Kiev 04114, Ukraine;***e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua*

A number of experimental and epidemiological investigations have provided evidence that the health status and aging rate may largely depend on the conditions in which an organism's early development takes place. In several recent studies, data are obtained suggesting that the effects of stresses in an early development can be inherited transgenerationally, causing changes of various characteristics in subsequent generations. There have been shown that epigenetic regulation of genetic expression, including DNA methylation, histone and microRNAs modifications, can play a key role in transgenerational inheritance. Until now, it has been generally accepted that the complete erasure of epigenetic marks takes place during the gametogenesis and early embryogenesis. In recent years, however, data were provided demonstrating that epigenetic marks could be not erased completely during these periods of early ontogenesis and some of them can likely be transmitted to the descendants of several generations affecting their phenotype. In this review, the data of epidemiological and experimental studies are provided showing the possibility of inheritance of life expectancy and associated with longevity traits in several generations.

Keywords: *life expectancy, epigenetics, regulation of genetic expression, developmental programming, transgenerational inheritance, review.*

Сведения об авторах

Забуга Оксана Геннадьевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории эпигенетики ГУ “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева” НАМН Украины, Киев. Тел.: +38 (044) 431-05-58; e-mail: narelem12@gmail.com

Вайсерман Александр Михайлович — докт. мед. наук, зав. лабораторией эпигенетики ГУ “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева” НАМН Украины, Киев. Тел.: +38 (044) 431-05-58; e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6+576.35:57.017.3+576.343

НЕКОТОРЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ, КАСАЮЩИЕСЯ ВЗАИМОСВЯЗИ АУТОФАГИИ, КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ

Г.В. Моргунова*, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов

*Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

В обзоре кратко описываются основные типы аутофагии — макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия. Анализируются данные о характере влияния аутофагии на возникновение некоторых патологических процессов и старение у различных организмов. Отмечается, что такое влияние, как правило (хоть и не всегда), является положительным. Рассматриваются результаты исследований данного феномена в экспериментах на мышах, нематодах, дрозофилах, бактериях, дрожжах и культурах клеток высших организмов. Подчеркивается очевидная связь активации аутофагии с ограничением клеточной пролиферации, которую авторы считают основной причиной накопления с возрастом различных дефектов (наиболее важные из них — повреждения ДНК) в клетках и тканях, что приводит к увеличению вероятности смерти, т.е. к старению. Заключается, что изучение роли аутофагии в процессе старения наиболее целесообразно проводить на моделях хронологического старения дрожжей или “стационарного старения” клеточных культур.

Ключевые слова: аутофагия, цитогеронтология, репликативное старение, “стационарное старение”, постмитотические клетки, ограничение клеточной пролиферации, обзор.

Аутофагия переводится с греческого как “самопоедание”, что вполне отражает суть процесса — различные цитоплазматические субстраты клетки доставляются в её лизосомы, где происходит их разрушение. Существует три основных типа аутофагии, которые различаются объёмом поглощаемых субстратов и механизмом доставки элементов цитоплазмы в лизосомы. Наиболее изученной является **макроаутофагия (МАФ)**, в результате которой происходит деградация органелл клетки и крупных макромолекул, для чего образуются специальные мембранные структуры — аутофаголизосомы. Сначала участок цитоплазмы с поврежденными субстратами поглощается двумембранным образованием — фагофорой, затем фагофора замыкается и становится аутофагосомой, после чего она сливается с лизосомой и в результате формируется аутофаголизосома. С помощью МАФ клетка может обновлять внутриклеточный неядерный материал [1], разрушая старые структуры и создавая из полученных в ходе “переваривания” строительных блоков новые.

При **микроаутофагии** участки лизосом образуют впячивания и поглощают таким образом небольшие структуры и макромолекулы, аутофагосомы не образуются. Другое название микроаутофагии — базальная аутофагия [2], так как этот процесс поддерживается в клетках на постоянном уровне. Микроаутофагию клетки также используют, когда им не хватает энергии. Именно так, переваривая небольшие участки цитоплазмы, получают энергию дрожжи [3].

Шаперон-опосредованная аутофагия не требует перестройки мембраны лизосом — “испорченные” белки переносятся в лизосомы при участии белков-шаперонов [4]. Только растворимые цитозольные белки могут быть транспортированы таким способом, причём эти белки должны пройти через процесс развёртывания (unfolding), чтобы попасть внутрь лизосомы [5]. Активность МАФ и шаперон-опосредованной аутофагии резко возрастает в ответ на стресс, это помогает клеткам адаптироваться к условиям окружающей среды [2].

С помощью МАФ могут также поглощаться и перевариваться патогенные микроорганизмы (бактерии, вирусы, микоплазмы), этот частный случай называется ксенофагией [6].

МАФ подвержены все клеточные структуры, но особенно большое значение имеет “переваривание” митохондрий (митофагия) [4, 7], так как контроль качества этих органелл является необходимым условием долгого существования клетки. С МАФ тесно связан процесс митохондриального биогенеза, в некоторых случаях образование новых митохондрий возможно только с использованием строительных блоков, полученных клеткой из “старых” митохондрий [4].

За последние десять лет интерес исследователей, в том числе и геронтологов, к аутофагии значительно возрос. По-видимому, именно этот процесс помогает клеткам избавиться от “испорченных” органелл, появляющихся в них при старении. Кроме того, целый ряд фактов свидетельствует о влиянии аутофагии на продолжительность жизни

и старение. Известно, что её активность уменьшается с возрастом, а многие возрастные патологии связаны с нарушением этого процесса [1, 4]. Стимулирование аутофагии может обеспечивать омолаживающий эффект [8]. Также известно, что влияние ограничения питания на продолжительность жизни опосредуется в значительной степени через аутофагию [1]. На наш взгляд, действие этого процесса на продолжительность жизни ограничено. Клетки могут получать питательные вещества за счёт переваривания собственной цитоплазмы, они также могут удалять повреждённые органеллы и макромолекулы и обновлять их, но в случае, если повреждения образуются в ДНК — главной матрице клетки, аутофагия становится бесполезной.

В настоящем обзоре мы хотели бы кратко рассмотреть данные о связи аутофагии (главным образом, МАФ) со старением организмов или клеточных культур, а также изложить некоторые наши соображения, касающиеся как интерпретации данных, получаемых при исследовании аутофагии в цитогеронтологических экспериментах, так и методологии таких исследований.

Аутофагия и старение

Согласно определению, которого мы придерживаемся, старение — это совокупность возрастных изменений организма, приводящих к увеличению вероятности его смерти [9-12]. Со временем способность организма противостоять воздействию окружающей среды падает, ухудшается способность сопротивляться инфекциям, увеличивается риск развития возрастных болезней. Вероятно, снижение активности аутофагии вносит свой вклад во все эти изменения.

Положительное влияние аутофагии на продолжительность жизни было показано на модельных организмах. Фармакологические манипуляции, связанные с ингибированием комплекса TOR (target of rapamycin), которые (как и ограничение питания) продлевают жизнь *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster*, активируют аутофагию [13, 14]. Генетическое ингибирование аутофагии у *C. elegans* приводит к тому, что продолжительность жизни не увеличивается при ограничении питания [15]. *D. melanogaster*, имеющие мутации в регулирующих аутофагию генах *Atg7* и *Atg8a* (*Atg* — autophagy-related genes), гиперчувствительны к окислительному стрессу и имеют более короткую продолжительность жизни, чем контрольные мушки [16, 17]. Усиление же экспрессии гена *Atg8a*, напротив, увеличивает их среднюю продолжительность жизни и устойчивость к окислительному стрессу [17]. У мутантов по гену *Atg7* наблюдается развитие нейродегенеративных патологий [16]. Кроме того, в нервной ткани *D. melanogaster* происходит возрастное снижение экспрессии генов аутофагии, которое влечёт за собой накопление маркёров нейродегенеративной патологии [17]. Нокаут генов *Atg5* и

Atg7 в мозге приводит к образованию включений в цитоплазме нейронов у мышей; подобные включения накапливаются в мозге при старении [18, 19]. Кроме того, было продемонстрировано, что эти гены необходимы для нормального функционирования центральной нервной системы — дефицит *Atg5* приводит к нарушениям в моторике [18], а дефицит *Atg7* — к нарушениям координации и к массовой потере нейронов в коре мозжечка и больших полушарий мозга у мышей [19]. В другой работе было показано, что нокаут гена *Atg7* в скелетной мускулатуре мышей приводит к атрофии мышечных волокон и развитию в них процессов дегенерации. У таких животных происходят накопление белковых агрегатов, повреждённых митохондрий и мембранных структур, а также растяжение саркоплазматического ретикулума, вакуолизация цитоплазмы и апоптоз в миоцитах [20]. Таким образом, поддержание активности аутофагии на определенном уровне — совершенно необходимое условие для нормального физиологического функционирования скелетных мышц и нейронов.

В стареющих клетках накапливаются повреждённые макромолекулы и органеллы [21, 22], этот материал является балластом, и клетке сложно от него избавиться. Причиной накопления подобного “мусора”, видимо, является в том числе и ухудшение аутофагии [23]. Необходимо подчеркнуть, что обновление клеточного материала с помощью МАФ крайне важно для постмитотических клеток, которые не могут делиться и обновлять таким способом своё содержимое. Сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания развиваются с возрастом как раз из-за того, что кардиомиоциты и нейроны накапливают в течение жизни организма балласт из белков и сломанных органелл. “Чистка” клеток с помощью аутофагии может помочь этим клеткам функционировать дольше.

Рассмотрим, как работает аутофагия в случае со скелетными мышечными клетками. С возрастом мышечные волокна теряют клетки и атрофируются, это происходит из-за дисбаланса синтеза и распада белков [24]. При голодании, нарушении иннервации или травмах, как и при старении, также происходит избыточная активация катаболических путей, что приводит к потере мышечной массы, поэтому логично было бы предположить, что аутофагия скорее наносит вред мышечным волокнам, чем защищает их. Однако данные упомянутой выше работы Масiero и Сандри [20] противостоят этому предположению. Нейроны в ещё большей степени подвержены накоплению деградировавших белков с возрастом [24]. Основные возрастные нейродегенеративные заболевания людей — болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорea Хантингтона — связаны с накоплением “балласта” в нервных клетках [1, 25]. Было обнаружено, что при болезни Альцгеймера β -амилоид накапливается в аутофагосомах, но слияния аутофагосом с лизосомами не происходит, вследствие чего пептид не

разрушается, как это должно происходить в нормальных нервных клетках. Как на мышцах с нейродегенеративными повреждениями, так и на плодовых мушках, для которых разработана модель болезни Хантингтона, было показано, что количество агрегатов мутантного белка хантингтина уменьшается, если индуцировать аутофагию [26]. В процесс избавления нервных клеток от “испорченных” органелл и белков вовлечены как МАФ, так и шаперон-опосредованная аутофагия. Поддержание этих типов аутофагии в “старых” нервных клетках на том же уровне, что и в “молодых”, вероятно, помогло бы избежать развития нейродегенеративных заболеваний.

Тем не менее, существует точка зрения, согласно которой аутофагии приписывают отрицательную роль в жизнедеятельности организма. Раковые клетки могут использовать этот процесс для выживания — например, после химиотерапии [27]. Было установлено, что воздействие противоопухолевых препаратов на клетки опухоли молочной железы и рака толстой кишки активирует аутофагию [28]. В то же время, для борьбы с опухолями некоторых типов используют ингибиторы аутофагии [29]. На наш взгляд, это лишний раз доказывает, что аутофагия — универсальный процесс, который помогает выживать любым клеткам. Как уже упоминалось в нашей предыдущей работе [30], важно различать влияние фактора на отдельные клетки внутри организма и влияние на сам организм. Например, переход клетки в “старческое” (senescent) состояние, с одной стороны, помогает организму, так как клетка не становится раковой, с другой — “старых” клеток становится много и они нарушают работу тканей и органов [31]. В случае, когда злокачественная опухоль уже образовалась, аутофагия не сможет помочь организму. Однако этот процесс могут использовать и нормальные клетки, особенно он нужен нейронам, кардиомиоцитам и долгоживущим иммунным клеткам памяти [4]. Мы всё же склонны считать, что аутофагия — это способ защиты клеток от неблагоприятных условий, а не инструмент для запуска их гибели.

Аутофагия, клеточное старение и ограничение пролиферации

В цитогеронтологии существуют две основные модели клеточного старения — модель Хейфлика (репликативное старение) [32, 33] и “стационарное старение” клеточных культур [21, 34–37]. При классическом репликативном старении “по Хейфлику” подсчитывают количество делений, которое совершили клетки. Нормальные клетки спустя определенное количество пассажей перестают делиться и становятся “состарившимися” (senescent), так как их теломеры сильно укорачиваются. На сегодняшний день часто используют модель, в которой клетки делают “сенесцентными”,

повреждая их, чтобы они не могли делиться. Это — так называемое стресс-индуцированное преждевременное старение (СИПС) [31, 35, 38]. Подобная постановка вопроса позволяет использовать в экспериментах не только нормальные, но и трансформированные клетки. Нужно заметить, что сторонники данной модели считают, что и аутофагия, и СИПС защищают организм от рака [39]. Существует также точка зрения, согласно которой аутофагия может служить пусковым механизмом, который активирует повреждение ДНК и запускает тем самым СИПС [40]. Нам кажется, что аутофагия в норме не должна индуцировать подобный процесс, этот эффект скорее связан с избыточной активацией аутофагии, которую вызывают, создавая не вполне физиологические условия (например, используя химиотерапию).

В качестве модельного объекта для изучения аутофагии часто используют дрожжи, являющиеся одноклеточными эукариотическими организмами, причём эксперименты преимущественно проводят в рамках хронологической модели старения, когда клетки достигают стационарной фазы роста и их пролиферация останавливается [41, 42]. Активация МАФ продлевает жизнь “хронологически стареющим” дрожжам [43, 44], а её подавление приводит к преждевременной гибели клеток [45]. Ограничение количества аминокислот в питательной среде приводит к увеличению продолжительности жизни *Saccharomyces cerevisiae*, но при нарушении процесса аутофагии этот эффект исчезает [46]. Таким образом, эффект ограничения питания у дрожжей, вероятно, опосредуется через аутофагию. Также доказано, что короткоживущие мутанты *S. cerevisiae* имеют мутации в генах *Atg* [46].

У бактерий существует механизм, сходный по принципу с аутофагией эукариот, который проявляется в уменьшении размеров клеток (“dwarfing”), так как часть цитоплазмы подвергается “перевариванию”. Этот процесс активируется также в стационарной фазе роста культуры [47] и помогает клеткам выжить в условиях нехватки питательных веществ.

“Стационарное старение” культур клеток многоклеточных организмов сходно с хронологическим старением у дрожжей [42]. Клетки становятся “старыми” в стационарной фазе роста, когда культура достигает монослоя, в результате чего под действием контактного торможения останавливается пролиферация. Данная модельная система базируется на концепции, согласно которой ограничение пролиферации приводит к накоплению макромолекулярных повреждений в клетках культуры, сходных с повреждениями, накапливающимися в постмитотических клетках многоклеточного организма с возрастом [21, 22, 48, 49]. В наших собственных экспериментах [50] мы неоднократно наблюдали вакуолизацию цитоплазмы “стационарно старых” трансформированных клеток китайского хомячка или нормальных фибробластов

человека, что свидетельствует о процессе активного переваривания цитоплазматического материала, когда органеллы и макромолекулы внутри клеток приобретают множество дефектов. Однако в лишенных возможности размножаться клетках процесс деградации продолжается, поэтому аутофагия рано или поздно перестает их “выручать”. Если в постмитотической клетке повреждаются не цитоплазматические структуры, а ядерные — и, что наиболее важно, ДНК, — то предотвратить негативные последствия подобных нарушений для клеток может лишь система репарации ДНК, но и она не может устранить абсолютно все ошибки. Впрочем, если в цитоплазме не будет повреждённых митохондрий, то и избыточного образования активных форм кислорода не произойдёт, а значит, снизится риск повреждения ДНК. Следует всё же подчеркнуть, что существуют организмы, которые идут другим путём — они просто сбрасывают клетки, которые накопили дефекты и заменяют их новыми. Именно так поступает пресноводная гидра [51]. За счёт высокой скорости пролиферации в организме гидры происходит “разбавление” испорченных клеток новыми. Для высших организмов и, в первую очередь человека, этот способ не годится, так как именно наличие высокодифференцированных клеточных популяций обеспечивает нормальное функционирование особи, поэтому таким организмам приходится искать способ для

устранения дефектов в постмитотических клетках. Однако даже в жизни гидры аутофагия играет важную роль, помогая полипу выживать при голодании [52], подавляя обновление клеток организма.

На наш взгляд, запускать МАФ лучше всего естественным путем, а не используя вещества, имитирующие эффект ограничения питания — рапамицин, ресвератрол и др., так как со временем к ним может развиваться привыкание [30, 53]. Именно таким естественным путем этот процесс активируется в нашей модели “стационарного клеточного старения”.

Заключение

Таким образом, несмотря на то, что существует мнение об аутофагии как о негативном регуляторе жизнедеятельности, доказательств её полезности (в том числе и “геронтологической”) всё же больше. Все типы аутофагии тем или иным способом влияют на продолжительность жизни, продлевая её. Так как аутофагия имеет большое значение для постмитотических клеток, то исследование роли этого процесса в детерминации продолжительности жизни и регуляции старения организмов на модели “стационарного старения” клеточных культур, когда пролиферация клеток остановлена с помощью контактного торможения, представляется наиболее целесообразным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rubinsztein D.C., Mariño G., Kroemer G. Autophagy and aging // *Cell*. 2011. Vol. 146. N 5. P. 682–695.
2. Mortimore G.E., Lardeux B.R., Adams C.E. Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. N 5. P. 2506–2512.
3. Vicencio J.M., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasdemir E., Morselli E., Ben Yunes A., Maiuri M.C., Lavandro S., Kroemer G. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path — A mini-review // *Gerontology*. 2008. Vol. 54. N 2. P. 92–99.
4. Yen W.-L., Klionsky D.J. How to live long and prosper: Autophagy, mitochondria, and aging // *Physiology (Bethesda)*. 2008. Vol. 23. P. 248–262.
5. Massey A.C., Kiffin R., Cuervo A.M. Autophagic defects in aging. Looking for an “emergency exit”? // *Cell Cycle*. 2006. Vol. 5. N 12. P. 1292–1296.
6. Levine B., Mizushima N., Virgin H.W. Autophagy in immunity and inflammation // *Nature*. 2011. Vol. 469. N 7330. P. 323–335.
7. Gottlieb R.A., Carreira R.S. Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010. Vol. 299. N 2. P. C203–C210.
8. Madeo F., Tavernarakis N., Kroemer G. Can autophagy promote longevity? // *Nat. Cell Biol.* 2010. Vol. 12. N 9. P. 842–846.
9. Khokhlov A.N. Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // *Russ. J. Gen. Chem.* 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.
10. Khokhlov A.N., Wei L., Li Y., He J. Teaching cyto-gerontology in Russia and China // *Adv. Gerontol.* 2012. Vol. 25. N 3. P. 513–516.
11. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.
12. Khokhlov A.N. What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // *Adv. Gerontol.* 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.
13. Bjedov I., Toivonen J.M., Kerr F., Slack C., Jacobson J., Foley A., Partridge L. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // *Cell Metab.* 2010. Vol. 11. N 1. P. 35–46.
14. Morselli E., Maiuri M.C., Markaki M., Megalou E., Pasparaki A., Palikaras K., Criollo A., Galluzzi L., Malik S.A., Vitale I., Michaud M., Madeo F., Tavernarakis N., Kroemer G. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy // *Cell Death. Dis.* 2010. Vol. 1. e10.
15. Meléndez A., Tallóczy Z., Seaman M., Eskelinen E.L., Hall D.H., Levine B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans* // *Science*. 2003. Vol. 301. N 5638. P. 1387–1391.
16. Juhász G., Érdi B., Sass M., Neufeld T.P. Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila* // *Genes Dev.* 2007. Vol. 21. N 23. P. 3061–3066.
17. Simonsen A., Cumming R.C., Brech A., Isakson P., Schubert D.R., Finley K.D. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila* // *Autophagy*. 2008. Vol. 4. N 2. P. 176–184.

18. Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito I., Okano H., Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice // *Nature*. 2006. Vol. 441. N 7095. P. 885–889.
19. Komatsu M., Waguri S., Chiba T., Murata S., Iwata J., Tanida I., Ueno T., Koike M., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice // *Nature*. 2006. Vol. 441. N 7095. P. 880–884.
20. Masiero E., Sandri M. Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles // *Autophagy*. 2010. Vol. 6. N 2. P. 307–309.
21. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
22. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochasticity? // *Biogerontology*. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.
23. Cuervo A.M., Bergamini E., Brunk U.T., Dröge W., Ffrench M., Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining “clean” cells // *Autophagy*. 2005. Vol. 1. N 3. P. 131–140.
24. Cuervo A.M., Dice J.F. How do intracellular proteolytic systems change with age? // *Front. Biosci.* 1998. Vol. 3. P. d25–d43.
25. Stefanova N.A., Kolosova N.G. Evolution of Alzheimer's disease pathogenesis conception // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 4–10.
26. Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J.E., Luo S., Oroz L.G., Scaravilli F., Easton D.F., Duden R., O'Kane C.J., Rubinsztein D.C. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease // *Nat. Genet.* 2004. Vol. 36. N 6. P. 585–595.
27. Gewirtz D.A. Autophagy and senescence. A partnership in search of definition // *Autophagy*. 2013. Vol. 9. N 5. P. 808–812.
28. Goehe R.W., Di X., Sharma K., Bristol M.L., Henderson S.C., Valerie K., Rodier F., Davalos A.R., Gewirtz D.A. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012. Vol. 343. N 3. P. 763–778.
29. Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., Mukherjee C., Shi Y., Gélinas C., Fan Y., Nelson D.A., Jin S., White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis // *Cancer Cell*. 2006. Vol. 10. N 1. P. 51–64.
30. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Interpretation of data about the impact of biologically active compounds on viability of cultured cells of various origin from a gerontological point of view // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 2. P. 67–70.
31. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer // *Annu. Rev. Physiol.* 2013. Vol. 75. P. 685–705.
32. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. Vol. 25. N 3. P. 585–621.
33. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1965. Vol. 37. N 3. P. 614–636.
34. Akimov S.S., Khokhlov A.N. Study of “stationary phase aging” of cultured cells under various types of proliferation restriction // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 854. P. 520.
35. Khokhlov A.N. Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cyto gerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2013. Vol. 68. N 4. P. 158–161.
36. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Ryndina T.S., Coll F. Pilot study of a potential geroprotector, “Quinton Marine Plasma”, in experiments on cultured cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 1. P. 7–11.
37. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. On the constructing of survival curves for cultured cells in cyto gerontological experiments: a brief note with three hierarchy diagrams // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 2. P. 67–71.
38. Jeyapalan J.C., Sedivy J.M. Cellular senescence and organismal aging // *Mech. Aging Dev.* 2008. Vol. 129. N 7–8. P. 467–474.
39. White E., Lowe S.W. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed // *Genes Dev.* 2009. Vol. 23. N 7. P. 784–787.
40. Young A.R., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J.F., Tavaré S., Arakawa S., Shimizu S., Watt F.M., Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition // *Genes Dev.* 2009. Vol. 23. N 7. P. 798–803.
41. Fabrizio P., Longo V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* // *Aging Cell*. 2003. Vol. 2. N 2. P. 73–81.
42. Khokhlov A.N. Which aging in yeast is “true”? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.
43. Alvers A.L., Wood M.S., Hu D., Kaywell A.C., Dunn W.A. Jr., Aris J.P. Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin // *Autophagy*. 2009. Vol. 5. N 6. P. 847–849.
44. Kaeberlein M., Burtner C.R., Kennedy B.K. Recent developments in yeast aging // *PLOS Genet.* 2007. Vol. 3. N 5. e84.
45. Herman P.K. Stationary phase in yeast // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. Vol. 5. N 6. P. 602–607.
46. Matecic M., Smith D.L., Jr., Pan X., Maqani N., Bekiranov S., Boeke J.D., Smith J.S. A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors // *PLOS Genet.* 2010. Vol. 6. N 4. e1000921.
47. Nyström T. Stationary-phase physiology // *Annu. Rev. Microbiol.* 2004. Vol. 58. P. 161–181.
48. Khokhlov A.N. Decline in regeneration during aging: appropriateness or stochasticity? // *Russ. J. Dev. Biol.* 2013. Vol. 44. N 6. P. 336–341.
49. Morgunova G.V., Kolesnikov A.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Senescence-associated β -galactosidase — a biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 165–167.
50. Shram S.I., Shilovskii G.A., Khokhlov A.N. Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 and aging: experimental study of possible relationship on stationary cell cultures // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006. Vol. 141. N 5. P. 628–632.
51. Khokhlov A.N. On the immortal hydra. Again // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
52. Chera S., Buzgariu W., Ghila L., Galliot B. Autophagy in *Hydra*: A response to starvation and stress in early animal evolution // *BBA—Mol. Cell Res.* 2009. Vol. 1793. N 9. P. 1432–1443.
53. Alayev A., Berger S.M., Kramer M.Y., Schwartz N.S., Holz M.K. The combination of rapamycin and resveratrol blocks autophagy and induces apoptosis in breast cancer cells // *J. Cell Biochem.* 2015. Vol. 116. N 3. P. 450–457.

GERONTOLOGY

SOME REMARKS ON THE RELATIONSHIP BETWEEN AUTOPHAGY,
CELL AGING, AND CELL PROLIFERATION RESTRICTION*G.V. Morgunova*, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov**Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia***e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

In the review the main types of autophagy (macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy) are shortly described. Data about character of influence of autophagy on the aging process and on the development of some neurodegenerative diseases in various organisms are analyzed. It is noted that this effect is usually (though not always) beneficial. Results of investigations of the phenomenon in experiments on mice, nematodes, fruit flies, bacteria, yeasts, and higher organisms' cell cultures are considered. Obvious relationship between autophagy activation and cell proliferation restriction is emphasized. The latter the authors believe to be the main cause of age-related accumulation in cells and tissues of various defects (the most important — DNA damage) that leads to the increase of death probability — i.e., to aging. It is concluded that studies of the role of autophagy in the aging process on the models of chronological aging in yeast or stationary phase aging of cell cultures could be considered as the most appropriate approach to the problem solution.

Keywords: *autophagy, cytogerontology, replicative aging, stationary phase aging, postmitotic cells, cell proliferation restriction, review.*

Сведения об авторах

Моргунова Галина Васильевна — аспирантка сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Клебанов Александр Александрович — научный сотрудник сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: klebanov@mail.bio.msu.ru

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

МЕТОДЫ

УДК 57.086.83+57.086.2

**ИНДУКЦИЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
ОСТЕОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК MG-63 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
В ТРЁХМЕРНЫХ УСЛОВИЯХ НА ФИБРОИНОВЫХ МИКРОНОСИТЕЛЯХ**

**М.С. Котлярова^{1,*}, В.А. Жуйков², Ю.В. Чудинова^{1,2}, Д.Д. Хайдапова³, А.М. Мойсенович⁴,
А.С. Коньков¹, Л.А. Сафонова^{1,5}, М.М. Боброва^{1,5}, А.Ю. Архипова⁴, А.В. Гончаренко⁴,
К.В. Шайтан¹**

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

² Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук; Россия, 119071, г. Москва, Ленинский просп., д. 33, стр. 2;

³ кафедра физики и мелиорации почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁴ межкафедральная лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁵ ФГБУ “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России; Россия, 123182, г. Москва, ул. Шуйкинская, д. 1

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Получены микроносители на основе фиброина шёлка. Микроносители могут использоваться в качестве субстрата для культивирования клеток, для доставки клеток при проведении клеточной терапии, а также для создания тканеинженерных конструкций. Фиброиновые микроносители были минерализованы, что привело к появлению кристаллов фосфата кальция на их поверхности. Способность минерализованных и не минерализованных микроносителей поддерживать остеогенную дифференцировку остеобластоподобных клеток линии MG-63 была оценена по уровню активности щелочной фосфатазы, раннего маркера остеогенеза. Было показано, что клетки активно пролиферировали на поверхности как минерализованных, так и немодифицированных микроносителей. Культивирование MG-63 на поверхности фиброиновых микроносителей приводило к повышению активности щелочной фосфатазы, что указывало на остеогенную дифференцировку клеток MG-63 в отсутствие индукторов. Уровень щелочной фосфатазы был выше при использовании минерализованных микроносителей. При традиционном двухмерном культивировании клеток MG-63 активность щелочной фосфатазы была близка к нулевому уровню. В отличие от традиционного монослойного культивирования при использовании микроносителей клетки находятся в трёхмерных условиях, более близких к физиологическим. Это может оказывать значительное влияние на их морфологию и функциональные свойства. В ходе работы также были охарактеризованы механические свойства пористых скаффолдов, использованных для получения микроносителей.

Ключевые слова: фиброин, остеогенная дифференцировка, минерализация, трёхмерное культивирование, микроноситель.

Микроносители — это частицы, размеры которых, как правило, не превышают 500 мкм, используемые для культивирования субстрат-зависимых клеток. Микроносители характеризуются высоким соотношением площадь/объем и могут использоваться для динамического культивирования клеток в биореакторах [1]. Такие системы используются для наработки клеток [2] или клеточных продуктов [3]. Микроносители позволяют наращивать большие количества клеток для терапевтического использования [4]. Культивирование клеток на микроносителях из биodeградируемых материалов дает возможность трансплантировать клетки без снятия с подложки. В этом случае клетки лучше сохраняют жизнеспособность, что обеспечивает

большую эффективность клеточной терапии [2]. Также биodeградируемые микроносители могут быть использованы для доставки и контролируемого высвобождения не клеточных терапевтических препаратов [5].

Микроносители в сочетании с остеогенными клетками могут применяться для восстановления дефектов кости [6]. Также они могут быть использованы для получения макроскопических тканеинженерных конструкций [7].

Остеогенная дифференцировка стимулируется растворимыми индукторами остеогенеза, однако известно, что физическая и химическая структура поверхности биоматериала может влиять на пролиферацию и дифференцировку клеток [8].

Шёлк имеет долгую историю применения в медицине в качестве шовного материала, а сравнительно недавно нашел применение в тканевой инженерии. Фиброин шёлка тутового шелкопряда *Bombyx mori* также может быть использован в качестве материала для микроносителей. Данный материал не токсичен, характеризуется высокой биосовместимостью и способностью к биорезорбции [9]. Ранее нами было показано, что микроносители на основе фиброина шёлка поддерживают адгезию и пролиферацию фибробластов и кератиноцитов — основных клеток, участвующих в регенерации кожи [10, 11].

Механические свойства фиброина позволяют изготавливать из него скаффолды, являющиеся основой тканеинженерных конструкций для регенерации костной ткани [12]. Показано, что имплантация скаффолда на основе фиброина приводит к существенному ускорению регенерации дефекта кости [13].

В данной работе было продемонстрировано стимулирование остеогенной активности клеток линии MG-63 в условиях трёхмерного культивирования на фиброиновых микроносителях и минерализованных фиброиновых микроносителях, а также изучены механические свойства пористых скаффолдов, на основе которых получены исследуемые микроносители.

Материалы и методы

Изготовление скаффолдов и микроносителей.

Скаффолды изготавливали из водного раствора фиброина (20 мг/мл).

Микроносители получали путем криоизмельчения пористых матриц [11]. Полученную суспензию калибровали через лабораторные сита с диаметром отверстий 500, 250 и 100 мкм (ООО «Крафт», Россия). Для дальнейшей работы использовали фракцию частиц размером 100–250 мкм.

Минерализация микроносителей. Минерализацию микроносителей проводили путем осаждения фосфата кальция [14]. Процесс был разделен на две стадии: прекальцификация и кальцификация. Для стадии прекальцификации готовили раствор, содержащий 4 г NaCl, 0,139 г CaCl₂, 0,152 г MgCl₂·6H₂O, 0,176 г NaHCO₃ и 0,089 г Na₂HPO₄·2H₂O в 100 мл воды очищенной на установке MilliQ, («Millipore», Франция). Все соли производства Sigma-Aldrich, Германия. Раствор насыщали углекислым газом при 37°C. Микрочастицы помещали в приготовленный раствор и инкубировали при 37°C в течение суток.

Раствор для проведения кальцификации, содержащий 4 г NaCl, 0,139 г CaCl₂, 0,03 г MgCl₂·6H₂O, 0,088 г NaHCO₃ и 0,089 г Na₂HPO₄·2H₂O в 100 мл воды насыщали углекислым газом при 50°C. Микрочастицы помещали в приготовленный раствор и инкубировали при 50°C в течение суток.

Минерализацию оценивали по окрашиванию фосфата кальция ализариновым красным (ARS).

Для этого микрочастицы помещали в 0,5%-ный раствор ARS (Panreac, Испания) при pH = 4,1–4,3 и инкубировали в темноте в течение часа. Далее образцы отмывали водой и изучали на инвертированном микроскопе Axiovert 200M LSM510 META (Carl Zeiss, Германия).

Культивирование MG-63 на микроносителях.

Клетки линии MG-63 культивировали в среде Eagle's minimal essential medium (EMEM) производства Lonza, (Бельгия), содержащей 1% Non-Essential Amino Acid (NEAA) производства Lonza (Бельгия) и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) производства HyClone (США). Микроносители стерилизовали 70%-ным спиртом и отмывали средой EMEM. В лунки 96-луночной круглодонной планки вносили по 50 мкл суспензии микроносителей и по 40 тыс. клеток MG-63 в 50 мкл в среды. Инкубировали 6 ч, затем переносили в лунки 24-луночной планки в 1 мл культуральной среды. Клетки на микроносителях культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂. Среду меняли каждые 3 сут.

Изучение клеток на поверхности микроносителей методом конфокальной микроскопии. На 1 и 4 сут культивирования клетки на микроносителях фиксировали 4%-ным формальдегидом. Ядра клеток окрашивали Sytox green (Sigma-Aldrich, Германия). Образцы изучали на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония) с объективом Plan Apo VC DIC N2 с 20-кратным увеличением и лазером с длиной волны 488 нм. Диаметр конфокальной диафрагмы, установки лазера и анализирующих фильтров настраивали согласно рекомендации производителей. Получали серии оптических срезов по всей толщине микроносителя.

Определение активности щелочной фосфатазы при культивировании MG-63 на микроносителях на основе фиброина. Остеогенная дифференцировка клеток оценивалась по уровню активности щелочной фосфатазы (ALP) на 7 сут культивирования на микроносителях. В качестве контроля использовали клетки, выращенные на культуральном пластике (двухмерные условия). Клетки лизировали в растворе TGT (50 mM Tris, 100 mM глицина и 0,1% Triton X-100, pH 10,5). В лунки с лизатом вносили по 100 мкл раствора бесцветного р-нитрофенилфосфата 10 мг/мл, инкубировали в темноте в течение 30 мин, затем реакцию останавливали, добавляя в лунки по 50 мкл 0,2 М NaOH. Под воздействием ALP от нитрофенил-фосфата отщепляется фосфатная группа, в результате чего образуется р-нитрофенол, имеющий желтый цвет. Активность щелочной фосфатазы оценивали по оптической плотности раствора при 405 нм.

Реология матриц из фиброина. Эксперименты по изучению механических свойств проводились на реометре Anton Paar MCR 302 (Австрия). Исследования проводились на влажных образцах. Реометр был оборудован измерительной системой плита/плита. Типичная толщина исследуемых об-

разцов составила 3–4 мм (это на порядок больше характерного размера пор), диаметр — 2,5 см. Сначала проводили амплитудный тест, чтобы определить диапазон линейной вязкоупругости при угловой частоте 10 рад/с. Процедура выбора расстояния между двумя плитами (зазора), при котором свойства образца измеряются корректно, была аналогична описанной ранее [15]. После измерения характерного диапазона линейной вязкоупругости (0,3%) и оптимального зазора (относительная деформация 0,1–0,3) на другом образце проводили частот-

ный тест при угловой частоте от 0,1 до 100 рад/с. Во всех тестах измеряли модули сохранения G' и потерь G'' , а также их отношение — коэффициент демпфирования (тангенс механических потерь):

$$\tan(\delta) = G''/G'.$$

Результаты и обсуждение

Из фиброиновых скаффолдов были получены микроносители. Микроносители представляли из себя фрагменты пористых матриц размером от 100 до 250 мкм (рис. 1, А).

Микроносители были подвергнуты минерализации фосфатом кальция. Окрашивание ARS подтвердило наличие минерализации (рис. 1, Б). Поверхность минерализованных микроносителей была покрыта кристаллами фосфата кальция, что увеличивало её шероховатость (рис. 1, Б).

Для оценки способности микроносителей поддерживать остеогенную дифференцировку использовали клетки остеосаркомы человека MG-63. Клетки этой линии проявляют свойства остеобластов и часто используются для модельного изучения остеогенеза [16]. При культивировании как на фиброиновых, так и на минерализованных фиброиновых микроносителях клетки MG-63 активно пролиферировали на поверхности микрочастиц (рис. 2, А–Г). Данный результат согласуется с рабо-

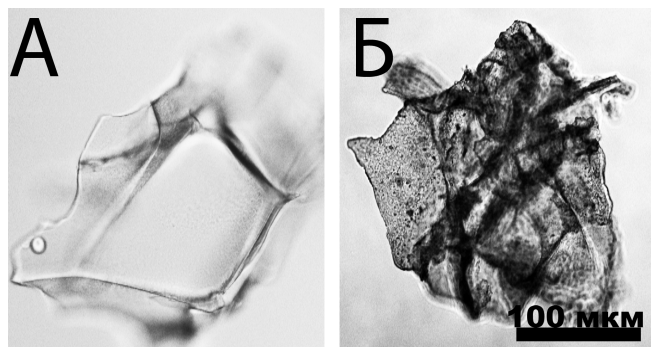


Рис. 1. Микрофотографии микроносителей, окрашенных ализириновым красным, в проходящем свете: А — фиброиновый микроноситель; Б — минерализованный микроноситель на основе фиброина

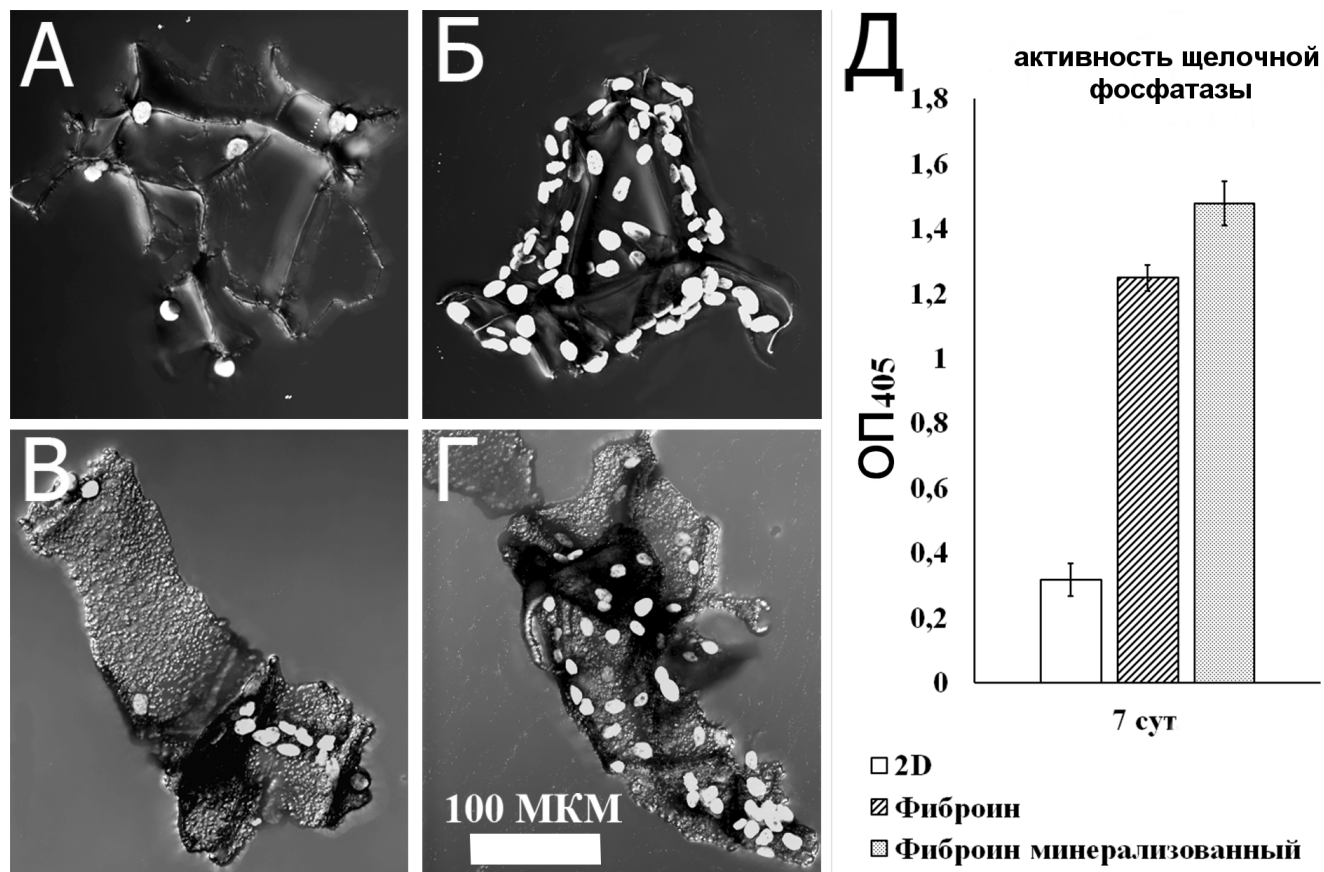


Рис. 2. А–Г — увеличение количества клеток на поверхности фиброиновых (А, Б) и минерализованных (В, Г) микроносителей на первые (А, В) и четвертые (Б, Г) сутки культивирования (представлены изображения ядер клеток, окрашенных Sytox green, наложенные на изображения частиц в проходящем свете); Д — активность щелочной фосфатазы при культивировании MG-63 на микроносителях и в двухмерных условиях.

той, в которой было продемонстрировано увеличение скорости адгезии и пролиферации первичной культуры мышинных эмбриональных фибробластов на поверхности минерализованных трёхмерных пористых фиброиновых скаффолдов [17].

Трёхмерные условия, создаваемые микроносителями, являются одним из факторов, способствующих индукции остеогенеза. Так, человеческие мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут спонтанно дифференцироваться по остеогенной линии на микроносителях с коллагеновым покрытием [18]. На рис. 2, Д представлены данные по определению активности щелочной фосфатазы, раннего маркера остеогенеза, при культивировании MG-63 на пластике в трёхмерных условиях: на фиброиновых микроносителях и минерализованных фиброиновых микроносителях в среде без добавления индукторов остеогенеза.

Уровень активности щелочной фосфатазы при культивировании клеток на микроносителях, как минерализованных, так и немодифицированных, оказался значительно выше, чем на культуральном пластике (рис. 2, Д). Кроме того, минерализация также вызывает повышение уровня активности щелочной фосфатазы ($p < 0,05$). Следовательно, минерализация микроносителей способствует индукции остеогенеза. Одна из возможных причин этого — изменение жёсткости субстрата. На коллагеновых матриксах было показано, что минерализация приводит к увеличению жёсткости матриксов [19]. Жёсткость субстрата может оказывать значительное влияние на функции клеток. На примере МСК было показано, что эффективность адгезии выше на мягких субстратах, в то время как остеогенная дифференцировка более выражена на жёстких субстратах [20].

Также на остеогенную дифференцировку может оказывать влияние присутствие фосфата кальция на поверхности микроносителей. Было показано, что остеобластоподобные клетки MG-63 и МСК, культивируемые на поверхности, сформированной из фосфата кальция, способны дифференцироваться по остеогенной линии *in vitro* без добавления индукторов остеогенеза, чего не происходит при культивировании клеток на пластике. Авторы предположили, что такое влияние фосфата кальция опосредовано повышенной адсорбцией некоторых белков к поверхности [8].

Минерализация поверхности микроносителей привела к появлению шероховатости (рис. 1, Б), что было показано с помощью сканирующей электронной микроскопии (данные не представлены). Наличие шероховатости также является одним из факторов, стимулирующих остеогенез [21].

Изучение механических свойств субстрата является важной задачей, поскольку эти свойства оказывают существенное влияние, например, на скорость миграции клеток [22], а также на экспрессию генов, клеточное развитие [23] и выживаемость [24].

В данной работе для описания механических характеристик матриксов использовали ротационную реометрию для характеристики вязкоупругости образца. Чтобы определить диапазон линейной вязкоупругости, обычно используют амплитудный тест, а для измерения зависимости свойств материала от частоты воздействия — частотный тест [25]. В случае с пористыми образцами, находящимися во влажном состоянии, добавляется еще один важный шаг — выбор зазора между плитами, при котором проводятся измерения. При слишком большом зазоре растет вероятность проскальзывания плиты по поверхности образца. При слишком маленьком зазоре возможно выталкивание воды из пор образца, а также изменение морфологии (уменьшение общего объема пор), что может влиять на измеряемые механические свойства [15].

Величина зазора (g) связана с относительной деформацией образца (ε) по формуле:

$$\varepsilon = (g_0 - g)/g_0,$$

где g_0 — точка контакта образца с плитой реометра, т.е. величина зазора, при котором нормальная сила, действующая на верхнюю плиту, равна нулю. При разных значениях зазора (и, соответственно, деформации) проводили амплитудный тест для регистрации изменения коэффициента демпфирования ($\tan(\delta)$) при сжатии образца.

Зависимость коэффициента демпфирования от относительной деформации представлена на рис. 3, А. Аналогичная зависимость наблюдалась на гидрогелях из поли-2-гидроксиэтилметакрилата [15]. На них было показано, что выбор зазора (относительной деформации) по коэффициенту демпфирования может быть более удобным, чем по значениям G' и G'' . При относительной деформации от 0 до 0,1 значение $\tan(\delta)$ падало, что говорит об улучшении контакта плиты с поверхностью образца. Далее на графике возникало плато, которое соответствует стабильному контакту образца и плиты. В качестве оптимальных значений относительной деформации выбирали середину этого плато, приблизительно 0,2. Большую деформацию не использовали, т.к. при ней происходит выталкивание воды из образца и сжатие пор.

Типичные результаты измерения вязкоупругих свойств матриксов из фиброина представлены на рис. 3, Б. Показано, что матриксы из фиброина представляют собой вязкоупругие тела, так как модуль сохранения G' выше, чем модуль потерь G'' ; среднее значение модуля сохранения при угловой частоте в 10 рад/с составило $5,9 \pm 1,1$ кПа, а модуль потерь — $0,8 \pm 0,2$ кПа (усреднение по результатам измерений, проведенных на пяти образцах).

Результаты частотного теста (рис. 3, Б) показали, что при увеличении частоты воздействия на образец значения модулей сохранения и потерь возрастали, однако G'' увеличивался в меньшей степени. С уменьшением угловой частоты происходит уменьшение модуля сохранения G' и в мень-

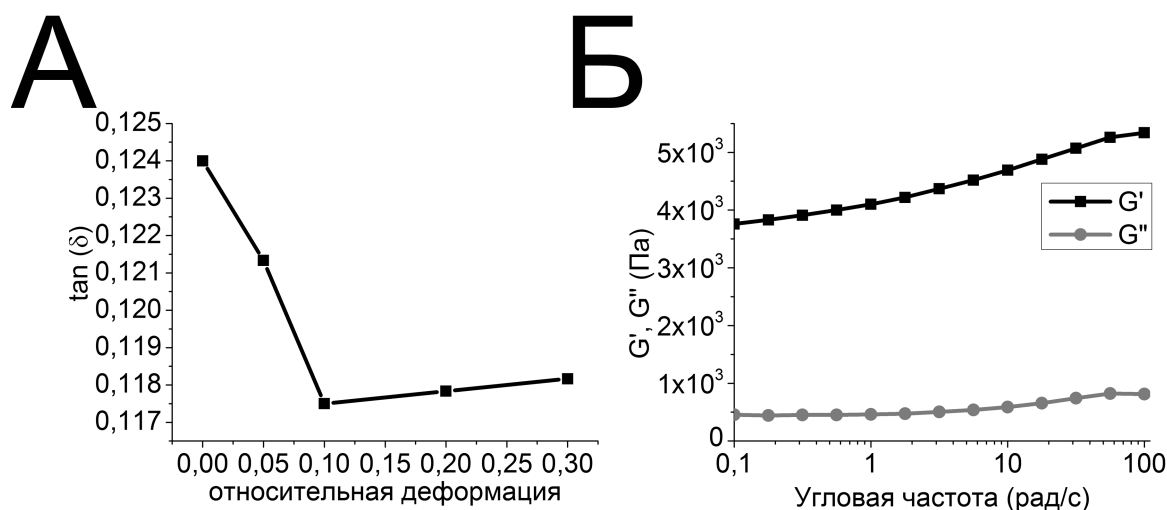


Рис. 3. А — зависимость коэффициента демпфирования от относительной деформации; Б — зависимость модуля сохранения (G') и модуля потерь (G'') от частоты воздействия.

шей степени модуля потерь G'' . Это говорит о том, что матриксы из фиброина не являются полностью сшитыми полимерами, для которых значения G' и G'' практически неизменны в широком диапазоне частот [25].

Таким образом, проведённые исследования показали, что разработанные нами фиброинозные микроносители являются превосходным субстратом для культивирования различных типов клеток, в том числе и остеогенных. За счет сложной формы, большой площади поверхности, микрорельефа и подходящих механических свойств микроносители формируют условия, способствующие остеогенной дифференцировке в отсутствие индукторов. Минерализация микроносителей приводит к улучшению остеогенных свойств субстрата, что может быть связано с появлением шероховатости на поверхности микроносителей, увеличением их жёсткости или остеиндуктивными свойствами фосфата кальция. Разработанные нами фиброинозные скаффолды, как в виде микроносителей, так и в виде

объемных пористых матриксов имеют большие перспективы в области тканевой инженерии регенерации костной ткани.

Работа осуществляется при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” по Соглашению по предоставлению субсидии от 27 ноября 2014 г. № 14.604.21.0148 “Биорезорбируемые микроносители для доставки клеток в область заживления и регенерации ран”, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0148.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета и на оборудовании центра коллективного пользования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Justice B.A., Badr N.A., Felder R.A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays // *Drug Discov. Today*. 2009. Vol. 14. N 1. P. 102–107.
2. Sun L.Y., Lin S.Z., Li Y.S., Harn H.J., Chiou T.W. Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research // *Cell Transplant*. 2011. Vol. 20. N 1. P. 49–62.
3. Costa A.R., Withers J., Rodrigues M.E., McLoughlin N., Henriques M., Oliveira R., Rudd P.M., Azeredo J. The impact of microcarrier culture optimization on the glycosylation profile of a monoclonal antibody // *Springerplus*. 2013. Vol. 2. N 1. P. 25.
4. Chen A.K.-L., Reuveny S., Oh S.K.W. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction // *Biotechnol. Adv.* 2013. Vol. 31. N 7. P. 1032–1046.
5. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Filatova E.V., Soboleva G.M., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shahtan K.V., Pov V.O., Kirpichnikov M.P. Sustained release of the antitumor drug paclitaxel from poly(3-hydroxybutyrate)-based microspheres // *Biochem. (Mosc.), Suppl., Ser. B Biomed. Chem.* 2012. Vol. 6. N 1. P. 42–47.
6. Yang Y., Rossi F.M.V., Putnins E.E. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28. N 20. P. 3110–3120.
7. Chen M., Wang X., Ye Z., Zhang Y., Zhou Y., Tan W.-S. A modular approach to the engineering of a centimeter-sized bone tissue construct with human amniotic mesenchymal stem cells-laden microcarriers // *Biomaterials*. 2011. Vol. 32. N. 30. P. 7532–7542.
8. Müller P., Bulnheim U., Diener A., Lüthen F., Teller M., Klinkenberg E.-D., Neumann H.-G., Nebe B., Liebold A., Steinhoff G., Rychly J. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. Vol. 12. N 1. P. 281–291.

9. Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I. Tissue regeneration *in vivo* within recombinant spidroin 1 scaffolds // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. N 15. P. 3887–3898.
10. Arkhipova A.Y., Kotlyarova M.S., Novichkova S.G., Agapova O.I., Kulikov D.A., Kulikov A.V., Drutskaya M.S., Agapov I.I., Moisenovich M.M. New silk fibroin-based bioresorbable microcarriers // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. Vol. 160. N 4. P. 491–494.
11. Moisenovich M.M., Kulikov D.A., Arkhipova A.Y., Malyuchenko N.V., Kotlyarova M.S., Goncharenko A.V., Kulikov A.V., Mashkov A.E., Agapov I.I., Palev F.N., Svistunov A.A., Kirpichnikov M.P. Fundamental bases for the use of silk fibroin-based bioresorbable microvehicles as an example of skin regeneration in therapeutic practice // *Ter. Arkh.* 2015. Vol. 87. N 12. P. 66–72.
12. Correia C., Bhumirata S., Yan L.-P., Oliveira A.L., Gimble J. M., Rockwood D., Kaplan D.L., Sousa R.A., Reis R.L., Vunjak-Novakovic G. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells // *Acta Biomater.* 2012. Vol. 8. N 7. P. 2483–2492.
13. Agapov I.I., Moisenovich M.M., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Trofimov K.V., Vasilyeva T.V., Konkov A.S., Arkhipova A.Y., Sokolova O.S., Guzev V.V., Kirpichnikov M.P. Biocomposite scaffolds containing regenerated silk fibroin and nanohydroxyapatite for bone tissue regeneration // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2011. Vol. 440. N 1. P. 228–230.
14. Yang L., Hedhammar M., Blom T., Leifer K., Johansson J., Habibovic P., van Blitterswijk C.A. Biomimetic calcium phosphate coatings on recombinant spider silk fibres // *Biomed. Mater.* 2010. Vol. 5. N 4. 045002.
15. Karpushkin E., Dušková-Smrčková M., Remmler T., Lapčíková M., Dušek K. Rheological properties of homogeneous and heterogeneous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels // *Polym. Int.* 2012. Vol. 61. N 2. P. 328–336.
16. Czekanska E.M., Stoddart M.J., Richards R.G., Hayes J.S. In search of an osteoblast cell model for *in vitro* research // *Eur. Cell. Mater.* 2012. Vol. 24. P. 1–17.
17. Moisenovich M.M., Arkhipova A.Y., Orlova A.A., Drutskaya M.S., Volkova S.V., Zacharov S.E., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P. Composite Scaffolds containing silk fibroin, gelatin, and hydroxyapatite for bone tissue regeneration and 3D Cell Culturing // *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6. N 1. P. 96–101.
18. Tseng P.C., Young T.H., Wang T.M., Peng H.W., Hou S.M., Yen M.L. Spontaneous osteogenesis of MSCs cultured on 3D microcarriers through alteration of cytoskeletal tension // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. N 2. P. 556–564.
19. Al-Munajjed A.A., Plunkett N.A., Gleeson J.P., Weber T., Jungreuthmayer C., Levingstone T., Hammer J., O'Brien F.J. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2009. Vol. 90B. N 2. P. 584–591.
20. Li X., Huang Y., Zheng L., Liu H., Niu X., Huang J., Zhao F., Fan Y. Effect of substrate stiffness on the functions of rat bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells *in vitro* // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2014. Vol. 102. N 4. P. 1092–1101.
21. Cheng Q., Rutledge K., Jabbarzadeh E. Carbon nanotube-poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering applications // *Ann. Biomed. Eng.* 2013. Vol. 41. N 5. P. 904–916.
22. Zaari N., Rajagopalan P., Kim S.K., Engler A.J., Wong J.Y. Photopolymerization in microfluidic gradient generators: microscale control of substrate compliance to manipulate cell response // *Adv. Mater.* 2004. Vol. 16. N 23–24. P. 2133–2137.
23. Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., M. Cordenonsi, Zanconato F., Le Digabel J., Forcato M., Bicciato S., Elvassore N., Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction // *Nature*. 2011. Vol. 474. N 7350. P. 179–183.
24. Wang H.B., Dembo M., Wang Y.L. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000. Vol. 279. N 5. P. C1345–1350.
25. Шрамм Г. Основы практической реологии и реометрии. М: КолосС, 2003. 312 с.

Поступила в редакцию 19.07.2016

Принята в печать 29.08.2016

METHODS

INDUCTION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF OSTEOBLAST-LIKE CELLS MG-63 DURING 3D CULTIVATION ON FIBROIN MICROCARRIERS

M.S. Kotlyarova^{1,*}, V.A. Zhuikov², Y.V. Chudinova^{1,2}, D.D. Khaidapova³, A.M. Moisenovich⁴, A.S. Kon'kov¹, L.A. Safonova^{1,5}, M.M. Bobrova^{1,5}, A.Y. Arkhipova⁴, A.V. Goncharenko⁴, K.V. Shaitan¹

¹ Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Research Center of Biotechnology, RAS, Leninsky prosp. 33–2, Moscow, 119071, Russia;

³ Department of Soil Physics and Reclamation, School of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁴ Laboratory of Confocal Microscopy, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁵ Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Shchukinskaya ul. 1, Moscow, 113182, Russia

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

We have developed microcarriers made from silk fibroins. Microcarriers can be used as a substrate for cell cultivation and cell delivery during cell-based therapy, and for the construction of bioengineered tissue. Fibroin microcarriers were mineralized, which led to the appearance of

calcium phosphate crystals on their surface. The ability of mineralized and non-mineralized microcarriers to support osteogenic differentiation of the osteoblast-like cell line MG-63 was estimated by alkaline phosphatase activity, an early marker of bone formation. The experiment showed cells actively proliferating on the surface of both mineralized and non-modified microcarriers. Culturing MG-63 on the surface of fibroin microcarriers resulted in an increase of alkaline phosphatase activity indicative of osteogenic differentiation of MG-63 cells in the absence of inductors. The level of alkaline phosphatase was higher when mineralized microcarriers were used. Alkaline phosphatase activity of MG-63 cells cultivated using traditional two-dimensional approaches were close to zero. As opposed to conventional monolayer culturing, microcarriers culture cells in a three-dimensional environment that is closer to physiological conditions. This can have a significant impact on their morphology and functional properties. During this study we also characterized mechanical properties of porous scaffolds used for microcarriers.

Keywords: *fibroin, osteogenic differentiation, mineralization, three-dimensional culture, micro-carrier.*

Сведения об авторах

Котлярова Мария Сергеевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Жуйков Всеволод Александрович — мл. науч. сотр. ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: vsevolod1905@ya.ru

Чудинова Юлия Владимировна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-06; e-mail yuli4_08@mail.ru

Хайдапова Долгор Доржиевна — доцент кафедры физики и мелиорации почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-36-84; e-mail dkhaydapova@yandex.ru

Мойсенович Анастасия Михайловна — соискатель межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail a-moisenovich@mail.ru

Коньков Андрей Сергеевич — соискатель межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-65; e-mail andrey.s.konkov@gmail.com

Сафонова Любовь Александровна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, инженер лаб. бионанотехнологий ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова”. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail saf.lyubov.msu@gmail.com

Боброва Мария Михайловна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, инженер лаб. бионанотехнологий ФГБУ “ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова”. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: mariabobrova.msu@gmail.com

Архипова Анастасия Юрьевна — мл.науч.сотр. межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: anastasia-yu-arkhipova@ya.ru

Гончаренко Анна Владимировна — вед. науч. сотр. межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: pylaevanna@gmail.com

Шайтан Константин Вольдемарович — проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail shaytan49@ya.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК: 582.282:581.95

НОВЫЕ ДЛЯ БЕЛОГО МОРЯ ВИДЫ МОРСКИХ ГРИБОВ

Е. Н. Бубнова

Беломорская биостанция имени Н.А. Перцова, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 184042, Карельская республика, пос. Приморский
e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

При исследовании морской микобиоты растительных остатков в окрестностях Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова были обнаружены многочисленные грибы, два из них являются новыми для Белого моря. Остатки приморских галофитов собирали в августе 2009 и 2015 гг. в зоне выбросов; работу проводили методами прямого наблюдения. Новый для Белого моря вид *Phaeosphaeria neomaritima* (R.V. Gessner et Kohlm.) Shoemaker et C.E. Babc. найден на 11 фрагментах, в основном на остатках приморского растения *Juncus atrofuscus* (ситник чёрно-бурый). *P. neomaritima* был обнаружен как в 2009 г., так и в 2015 г., в разных точках исследованного участка. Аскокарпы гриба были недозрелыми, видимо, на Белом море они созревают позднее середины августа. Второй вид, *Pleospora triglochinicola* Webster. является новым не только для Белого, но и для всех морей России. Он был обнаружен на 12 фрагментах галофита *Triglochin maritima* (триостенник приморский), в оба года исследования, в разных точках исследованного участка. Очевидно, оба вида являются обычными на исследованной территории. В статье приводятся описания и фотографии находок, а также обсуждается экология и общее распространение данных видов.

Ключевые слова: морские грибы, аскомицеты, растительные остатки, Белое море, *Phaeosphaeria neomaritima*, *Pleospora triglochinicola*.

Исследования микобиоты Белого моря были начаты в 1961 г. в окрестностях Беломорской биостанции имени Н.А. Перцова (ББС) в Кандалакшском заливе. За прошедшие годы здесь в различных экотопах было обнаружено более 300 видов грибов и грибоподобных организмов [1]. В настоящее время этот участок Белого моря является одним из наиболее полно обследованных микологами районов Мирового океана. На территории России проводились многочисленные исследования грибов не только на Белом море, но и в некоторых районах Чёрного [2], Охотского и Японского [3] морей. В Российских морях изучают микобиоту в основном донных и литоральных грунтов и талломов водорослей-макрофитов; в Чёрном и Японском морях — также погружённой в воду древесины. Грибы, ассоциированные с прибрежной растительностью, очень слабо изучены во всех морях России [1, 2, 3]. Приморские галофиты являются важным компонентом прибрежных экосистем Белого моря, массово заселяющими среднюю и верхнюю литораль [4]. В ходе работ мы обнаружили, что на остатках этих растений в окрестностях ББС присутствуют многочисленные аскокарпы и другие структуры грибов, а сами эти остатки пронизаны мицелием. Была проведена работа по выявлению видового состава этих грибов, в результате которой выяснилось, что среди них присутствуют представители двух видов, неизвестных ранее для Белого моря, а один из них неизвестен также и для других морей России.

Материалы и методы

Материалами для нашего исследования послужили перезимовавшие остатки высших растений, произрастающих в приливно-отливной зоне. Хотя сами эти растения обитают на верхней и средней литорали, их остатки выносятся к верхней границе литорали, в зону выбросов, где они и были собраны. Работы проводили в первой половине августа 2009 и 2015 гг. в ближайших окрестностях ББС. Общая длина обследованного участка побережья составила примерно 1,6 км. Начало участка, к западу от ББС, — “Чёрные Щели” (66°33'10,7" с.ш., 33°05'22,6" в.д.), окончание, к востоку от ББС, — “Еремеевский порог” (66°32'6" с.ш., 33°07'03" в.д.). На выбранном участке собирали растительные остатки с признаками присутствия грибов, помещали их в бумажные пакеты, и не позднее, чем через две недели, проводили видовую идентификацию без инкубации, с использованием бинокулярной лупы и микроскопа [5, 6]. Для большинства образцов растительных остатков удалось установить их видовую принадлежность [4]. Всего было собрано 122 фрагмента таких растительных остатков, на которых были выявлены 18 различных морфотипов грибов. Часть из них — уже известные для данного района виды [1], часть — сомнительные виды, не поддающиеся морфологической идентификации и требующие дальнейших исследований (*Phomas* sp., *Alternarias* sp., *Puccinia* cf. *littoralis*). Два из идентифицированных видов оказались но-

выми для микобиоты Белого моря; для них сделаны описания и микрофотографии с помощью фотокамеры и микроскопа Leica (Германия).

Результаты и обсуждение

Ниже приведены классификация и морфологические описания обнаруженных видов.

Phaeosphaeria neomaritima (R.V. Gessner & Kohlm.) Shoemaker & C.E. Babc.

Syn.: *Heptameria maritima* (Cooke & Plowr.) Cooke

Leptosphaeria maritima (Cooke & Plowr.) Sacc.

Leptosphaeria neomaritima R.V. Gessner & Kohlm.

Sphaeria maritima Cooke & Plowr.

Аскокарпы темно-коричневые, почти чёрные, округлые, около 0,2–0,3 мм в диаметре, одиночные. В исследованном материале большинство из них были полупогружены в субстрат, немногие поднимались из него (рис. 1, А). Некоторые аскокарпы были с хорошо заметной шейкой (папиллой). Псевдопарафизы присутствовали, многочисленные в области остиолы, простые, нитевидные, септированные. Сумки булабовидные, удлинённые, восьмиспоровые, длиной 100–140 мкм и шириной 10–28 мкм, с довольно толстыми, хорошо различимыми стенками, битуникатные (рис. 1, Б). Споры длиной 30–42 мкм и шириной 6–12 мкм, овально-веретеновидные, некоторые слегка изогнутые, в основном с 4–5 септами. У многих спор хорошо заметно, что третья клетка с конца немного толще остальных (рис. 1, В; рис. 1, Г). В исследованном материале большинство спор были гиалиновыми, лишь единичные имели жёлтовато-коричневую окраску. Вокруг спор хорошо заметен слизистый чехол, 2–3 мкм толщиной. Признаки исследованных изолятов хорошо укладываются в описание вида, известное из литературы [5, 6].

Ph. neomaritima был обнаружен на 11 фрагментах растительных остатков, в основном — на стеблях *Juncus atrofusculus* Rupr., а также на 4 неидентифицированных фрагментах. Он был обнаружен как в 2009, так и в 2015 гг. в разных точках исследованного участка. Видимо, он является здесь весьма обычным. В исследованном материале большинство структур размножения были уже сформированными, но ещё незрелыми. В частности, к таким ювенильным признакам относятся погружённые в субстрат псевдотеции и несформированная окраска спор [5]. Очевидно, в условиях Белого моря окончательное созревание спор данного вида происходит позднее середины августа, и, возможно, связано с плодоношением и отмиранием растений-хозяев.

По литературным данным, *Ph. neomaritima* является сапротрофом на разлагающихся стеблях видов из родов *Juncus* и *Spartina* в Атлантическом океане: на побережьях Англии, США (от Флориды до Вирджинии) и Канады [5]. Кроме того, *Ph. neomaritima* встречается на побережье Румынии и в северо-западной части Чёрного моря [2, 7]. Другие публикации, в которых упоминается данный вид — это обзоры по биоразнообразию морских грибов [6, 8], и филогенетические построения [9]. В этих работах не содержится сведений о новых находках, а все морфологические описания приводятся по более ранним источникам [5]. Тем не менее, *Ph. neomaritima*, видимо, имеет широкую распространённость от субтропических до субарктических вод. Наши находки являются самыми северными из известных, кроме того, это первые находки на новом хозяине — *J. atrofusculus*.

Pleospora triglochnicola Webster

Anamorph.: *Stemphylium triglochnicola* Sutton & Pirozynski

Syn.: *Pleospora maritima* Rehm

Аскокарпы практически чёрные, округлые, около 0,5 мм в диаметре, одиночные, некоторые приплюснутые; в исследованном материале при-

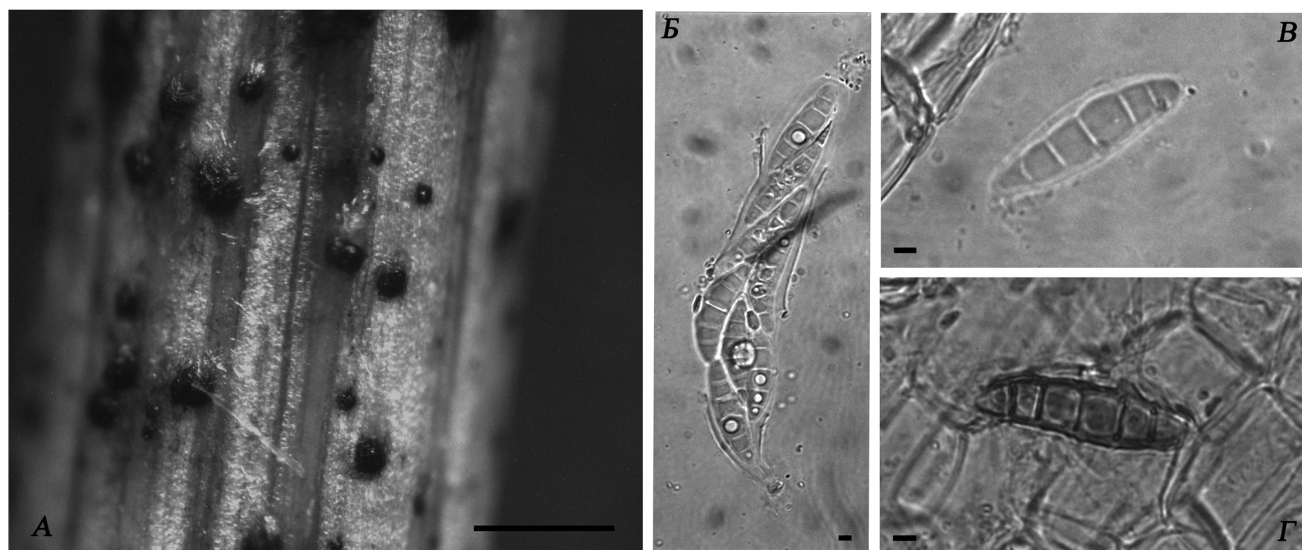


Рис. 1. *Phaeosphaeria neomaritima*. А — стебель *Juncus atrofusculus* с аскокарпами гриба, Б — сумка с разорванной внешней оболочкой, В — гиалиновая незрелая спора, Г — окрашенная аскоспора; длина линейки: А — 1 мм, Б, В, Г — 10 мкм.

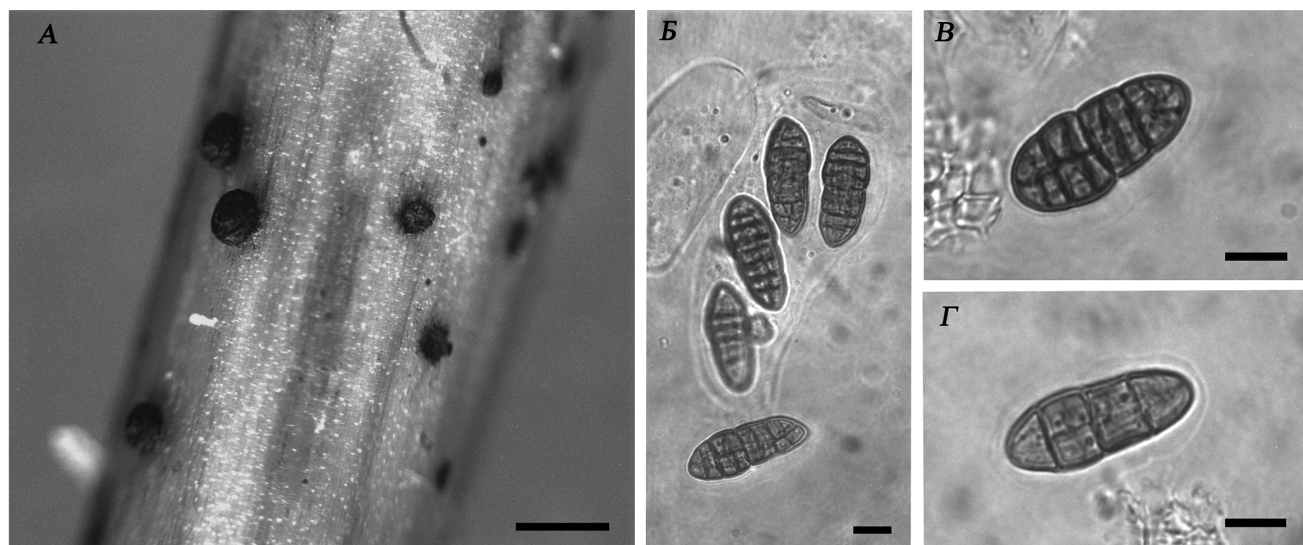


Рис. 2. *Pleospora triglochinicola*. А — стебель *Triglochin maritima* с аскокарпами гриба, Б — вскрытая сумка с разорванной внутренней оболочкой, В и Г — аскоспоры; длина линейки: А — 1 мм, Б, В, Г — 20 мкм.

существовали как полупогружённые в субстрат, так и расположенные на его поверхности. Приплюснутыми выглядели аскокарпы, расположенные на поверхности субстрата (рис. 2, А). На аскокарпах хорошо заметна шейка (папилла); лучше она видна на полупогружённых в субстрат. Псевдопарафизы немногочисленные, простые, нитевидные. Сумки булабовидные, заметно расширенные, восьмиспоровые, длиной 160–180 мкм и шириной 40–45 мкм, с толстыми, хорошо различимыми стенками, битуникатные (рис. 2, Б). Споры длиной 50–60 мкм, шириной 18–24 мкм, муральные, почти овальные, с расширением к верхнему концу. В исследованном материале большинство спор имели жёлто-коричневую окраску (рис. 2, В; рис. 2, Г). У всех спор хорошо заметен толстый слизистый чехол. Конидиальная стадия не была обнаружена. Признаки исследованных нами изолятов хорошо укладываются в описание данного вида, известное из литературы [5, 6, 10].

P. triglochinicola был обнаружен на 12 фрагментах растительных остатков, все они были отнесены нами к стеблям *Triglochin maritima* L. [4]. Данный вид присутствовал в сборах фрагментов растений в 2009 и 2015 гг., в разных точках исследованного участка, в двух из них он был обнаружен и в 2009, и в 2015 гг. Очевидно, данный вид является здесь весьма обычным. Большинство структур размножения были созревшими, некоторые псевдотеции уже пустыми. Таким образом, спороношение данного вида в условиях Белого моря, видимо, приходится на конец июля–август.

Впервые данный вид был описан на перезимовавших соцветиях *Triglochin maritima*, собранных в январе 1969 г. на восточном побережье Англии [10]. В материале содержались незрелые аскокарпы, описание вида было сделано после инкубации. В этой же работе установлена связь данного вида с анаморфным видом *Stemphylium triglochinicola*. Из-

вестно о находках в Атлантическом океане (Дания) и Северном Ледовитом океане (Норвегия); в качестве единственного хозяина указывается *T. maritima* [5]. Более поздние упоминания *P. triglochinicola* крайне немногочисленны и не содержат новых находок. Это обзор морской микобиоты Европы, выпущенный в 2006 г. [9] и две работы 2009 г. — статья, посвященная филогении части представителей рода *Pleospora* [11], и обзор разнообразия морских грибов [6]. В целом, можно предположить, что данный вид может быть обычным в местах произрастания его хозяина, Тригложина — в бореальных и арктических, а возможно, также и в более тёплых водах.

Таким образом, впервые в Белом море мы обнаружили двух представителей порядка Pleosporales класса Dothideomycetes: *Phaeosphaeria neomaritima* из семейства Phaeosphaeriaceae и *Pleospora triglochinicola* из семейства Pleosporaceae [12]. Второй из обнаруженных видов является новым для морей России. Незначительное число упоминаний обнаруженных нами видов, скорее всего, связано с тем, что остатки маршевых галофитов являются не очень популярным субстратом при исследованиях морской микобиоты. Большинство морских микологических работ проводились и проводятся с такими субстратами, как погружённая в море древесина или донные грунты [5, 6]. Вместе с тем, даже результаты небольшого исследования, проведённого на ограниченном участке побережья, позволяют предполагать, что эти виды — обычные обитатели в районах, где есть галофитная литоральная растительность. Таких районов в холодных водах довольно много, и растительность приморских маршей является важным компонентом прибрежных экосистем [4].

Работа выполнена при частичной (анализ данных, обработка фотографий) финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bubnova E.N., Grum-Grzhimaylo O.A., Kononova O.P., Marfenina O.E. Fifty years of mycological studies at the White Sea Biological Station of Moscow State University: challenges, results, and outlook // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N. 1. P. 23–39.
2. Копытина Н.И. Высшие морские грибы пелагических и донных биотопов Северо-Западного региона Чёрного моря. Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. Севастополь, 2009. 24 с.
3. Пивкин М.В. Вторичные морские грибы Японского и Охотского морей. Автореф. Диссертации докт. биол. наук. Москва: МГУ, 2010. 40 с.
4. Флора и фауна Белого моря: иллюстрированный атлас / Под ред. А.Б. Цетлина, А.Э. Жадан и Н.Н. Марфенина. М.: Т-во научных изданий КМК, 2010. 471 с.
5. Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine mycology — the higher fungi. Academic Press, 1979. 690 p.
6. Jones E.B.G., Sakayaroj J., Suetrong S., Somrithipol S., Pang K.-L. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota // Fungal Diversity. 2009. Vol. 35. P. 1–203.
7. Aleem A.A. Marine fungi from Romania // Cercetari Marine, Institutul Roman de Cercetari Marine, Constanta. 1974. N 7. P. 27–55.
8. Landy E.T., Jones G.M. What is the fungal diversity of marine ecosystems in Europe? // Mycologist. 2006. Vol. 20. N 1. P. 15–21.
9. Shoemaker R.A., Babcock E. Phaeosphaeria // Can. J. Bot. 1989. Vol. 67. N. 5. P. 1500–1599.
10. Webster J. The *Pleospora* state of *Stemphylium triglochinicola* // Trans. Brit. Mycol. Soc. 1969. Vol. 53. N. 3. P. 478–482.
11. Inderbitzin P., Mehta Y.R., Berbee M.L. *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora herbarum* clade // Mycologia. 2009. Vol. 101. N. 3. P. 329–339.
12. Suetrong S., Schoch C. L., Spatafora J. W., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Sakayaroj J., Phongpaichit S., Tanaka K., Hirayama K., Jones E. B. G. Molecular systematics of the marine Dothideomycetes // Stud. Mycol. 2009. Vol. 64. P. 155–173.

Поступила в редакцию 03.07.2016

Принята в печать 29.08.2016

MICOLOGY AND ALGOLOGY

TWO MARINE FUNGI NEW FOR THE WHITE SEA

E.N. Bubnova

*N.A. Pertsov White Sea Biological Station, Lomonosov Moscow State University, Primorsky sett., Karelia Republic, 184042, Russia
e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru*

In the study of marine mycobiota of decaying plant materials near the N.A. Pertsov White Sea Biological Station numerous fungi were found, two of them are new to the White Sea. Residues of littoral halophytes were collected in August 2009 and 2015 in the supralittoral area; the work carried out by non-cultural methods. New to the White Sea species *Phaeosphaeria neomaritima* (R.V. Gessner et Kohlm.) Shoemaker et C.E. Babc. were found on 11 fragments, mostly on the residues of halophyte plants *Juncus atrofusculus* (rush). *P. neomaritima* was detected in both years the research in different points of the investigated area. Ascocarps of this fungus were immature. Apparently, on the White Sea they mature later than mid-August. The second species, *Pleospora triglochinicola* Webster., it is new not only for White Sea, but for all Russian Seas. It was found in the 12 fragments of halophyte *Triglochin maritima* (triglochin), in both year of the study, on different points of investigated area. Obviously, both species are common in the study area. The article contains descriptions and photographs of findings, as well as discussion on the environmental and geographical distribution of these species.

Key words: *marine fungi, ascomycetes, plant materials, White Sea, Phaeosphaeria neomaritima, Pleospora triglochinicola.*

Сведения об авторе

Бубнова Екатерина Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-54-82; e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 577.151.52:582.284

ШТАММОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СИНТЕЗА СПЕЦИФИЧЕСКИХ
МОЛОКОСВЁРТЫВАЮЩИХ ПРОТЕИНАЗ У БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА
IRPEx LACTEUS

О.В. Чемерис*, В.В. Рашевский, К.А. Галкова, М.И. Бойко

кафедра физиологии растений биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»;

Украина, 83050, г. Донецк, ул. Щорса, д. 46

*e-mail: chemeris07@rambler.ru

Изучена способность к синтезу протеиназ молокосвёртывающего (сычужного) действия у 8 штаммов базидиального гриба *Irpex lacteus*. Установлено, что исследованные штаммы *I. lacteus* отличаются между собой по ферментативной активности культуральной жидкости. Максимальная молокосвёртывающая активность штаммов *I. lacteus* 2425, 2426 и 2427 наблюдалась в экспоненциальную фазу роста на 15-е сутки культивирования на глюкозо-пептонной среде. Данные штаммы *I. lacteus* являются наиболее перспективными продуцентами энзимов сычужного действия для дальнейшего исследования и практического использования. Штаммы *I. lacteus* 2421, 2422, 2423, 2424 и 2428 проявили более низкие значения ферментативной активности и требуют дополнительных исследований по подбору оптимальных условий культивирования.

Ключевые слова: базидиомицет *Irpex lacteus*, штаммы, молокосвёртывающая (сычужная) активность, экзопроотеиназы, продуцент, культуральная жидкость.

В последнее время учёные уделяют особое внимание исследованию протеолитических ферментов высших базидиальных грибов [1–4], которые широко используются во многих странах мира. Наиболее актуальными являются исследования, связанные с поиском и получением заменителей сычужного фермента животного происхождения — реннина (химозина). Замена общепризнанного, но слишком дорогого сычужного (молокосвёртывающего) фермента микробными или грибными протеазами узкого специфического действия, является экономически выгодным и перспективным направлением сыроварения [5, 6].

Многочисленные исследования показали, что базидиальные грибы являются активными продуцентами протеиназ сычужного действия, которые по своим свойствам не уступают ферментам животного происхождения [7–10]. Наиболее активными продуцентами реннина являются грибы *Phellinus chrysoloma*, *Kuehneromyces mutabilis* и *Ganoderma applanatum* [7], *Schizophyllum commune* [11], *Irpex lacteus* [5, 6, 12], *Pleurotus ostreatus* [13], *Cerrena* sp. и *Coprinus lagopides* [14]. Большинство базидиомицетов не спороносят в культуре и являются съедобными. Особый интерес представляет собой возможность использования культуральной жидкости таких грибов для получения ферментных препаратов — протеиназ молокосвёртывающего действия.

Исследований по выделению заменителей сычуга из высших грибов проведено недостаточно. Японскими учёными были исследованы 44 штамма базидиомицетов на способность синтезировать молокосвёртывающий фермент. Было установлено,

что два вида грибов — *Irpex lacteus* и *Fomitopsis pinicola* — образуют протеиназы, которые являются хорошими заменителями сычужных энзимов [9]. Причем гриб *I. lacteus* является наиболее перспективным, так как его культуральная жидкость показала высокую активность ферментов сычужного действия, а по характеру действия ферментный препарат наиболее близок к животному реннину.

Ежегодно выделяется большое количество штаммов чистых культур базидиомицетов. Однако только некоторые представители из этих выделенных штаммов могут составить конкуренцию сычужному ферменту и быть перспективными для дальнейших исследований. Разные штаммы одного вида гриба могут проявлять значительную изменчивость в процессах синтеза биологически активных веществ.

В связи с этим целью наших исследований была оценка штаммовой изменчивости новых штаммов базидиального гриба *I. lacteus* к синтезу фермента сычужного (молокосвёртывающего) действия и отбор среди них наиболее активных продуцентов.

Материалы и методы

Объекты исследования и условия культивирования. Скрининг продуцентов ферментов молокосвёртывающего действия проводили на 8 штаммах базидиального гриба *I. lacteus* (Fr.) Fr. 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428 из коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины (Национальное достояние Украины).

Штаммы гриба культивировали глубинным способом в статических условиях на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза — 10, пептон — 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KH_2PO_4 — 0,6, K_2HPO_4 — 0,4, CaCl_2 — 0,05, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 (“Реакхим”, Россия). Кислотность питательной среды доводили до значения pH 4,0 с помощью 10 %-го раствора HCl. Культивирование штаммов проводили при температурах, оптимальных для роста.

Определение молокосвёртывающей активности культуральной жидкости. Активность протеиназ молокосвёртывающего действия в культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* проводили через каждые 5 сут, начиная с 5-х и заканчивая 25-ми сут культивирования, по методу Каваи и Мукаи [9]. За единицу молокосвёртывающей активности (МСА) принимали такое количество фермента, которое створаживает 100 мл молока за 40 мин при 35°C.

Определение белка в культуральной жидкости. Содержание белка в культуральной жидкости определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) [15], используя формулу Лайне [16].

Определение абсолютно сухой биомассы. Накопление биомассы штаммов *I. lacteus* определяли весовым методом. Мицелий штаммов отделяли фильтрованием от культуральной жидкости и высушивали при 105°C до постоянного веса.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Все исследования проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью дисперсионного анализа, а сравнение средних арифметических величин — с помощью критерия Дункана [17].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлено распределение молокосвёртывающей активности культуральной жидкости исследованных штаммов *I. lacteus* по времени. На 5-е сут культивирования молокосвёртывающая активность культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* составляет 18,87–135,16 Е/мл. При этом для штаммов *I. lacteus* 2421, 2422, 2424, 2425 уровень ферментативной активности ниже, чем для штаммов 2423, 2426, 2427 и 2428. На 10-е сутки культивирования штаммов *I. lacteus* 2421, 2422, 2423, 2424, 2425 молокосвёртывающая активность их культуральной жидкости возрастает в два и более раз; для штамма 2428, напротив, наблюдается снижение активности почти в два раза; а для штаммов *I. lacteus* 2426 и 2427 максимальная активность фермента приходится на 5-е сут, на 10-е сут происходит её снижение. При дальнейшем культивировании молокосвёртывающая активность культуральной жидкости штаммов данного гриба повышается. Повышение уровня ферментативной активности на 30% отмечается для штаммов 2421, 2424, снижение — для штамма 2423. Максимальные значения

уровня молокосвёртывающей активности культуральной жидкости (210,74–290,18 Е/мл) зафиксированы для штаммов *I. lacteus* 2425, 2426 и 2427 на 15-е сут культивирования. Дальнейшее культивирование гриба *I. lacteus* приводит к постепенному снижению молокосвёртывающей активности протеиназ штаммов 2421, 2422, 2425, 2426 и 2427. Для штамма 2428 ферментативная активность культуральной жидкости значительно снижается. Исключение составляют штаммы *I. lacteus* 2423 и 2424, уровень сычужной активности которых повышается на 25-е сут культивирования до значений 212,52 Е/мл и 220,45 Е/мл, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что штаммы одного гриба отличаются по синтезу специфического молокосвёртывающего фермента. Такая изменчивость может быть следствием различия условий, необходимых для культивирования штаммов гриба *I. lacteus*, — начальные значения pH питательной среды одинаковые, а температурные режимы, необходимые для оптимального роста, различаются. Изученные штаммы можно условно разделить на две группы. Первая группа — штаммы 2425, 2426, 2427, проявляющие высокую молокосвёртывающую активность на уровне 210–290 Е/мл, вторая группа — штаммы 2421, 2422, 2423, 2424, 2428 с низкой активностью на уровне 100–150 Е/мл. В то же время анализ литературы показал, что штаммы гриба *I. lacteus* значительно превышают показатели культур *Coprinus lagopides* и *Cerrena* sp., отобранных в качестве потенциальных продуцентов молокосвёртывающих ферментов [14].

Содержание белка в культуральной жидкости исследуемых штаммов показано на рис. 2. Можно отметить, что на 5-е сут культивирования базидиомицета уровень содержания белка соответствует уровню контроля или ниже его, что указывает на использование белка грибом. При дальнейшем выращивании грибов на 10-е и 15-е сут происходит значительное повышение белка в культуральной жидкости штаммов *I. lacteus* 2423, 2425, 2426 и 2427. Именно в этот период наблюдается высокая молокосвёртывающая активность культуральной жидкости изученных штаммов, что свидетельствует об активном синтезе экзопротеиназ молокосвёртывающего действия. Для штаммов *I. lacteus* 2421, 2422, 2424 и 2428 наряду с синтезом экзопротеиназ сычужного действия происходит и активное потребление белка, содержащегося в исходной питательной среде.

На рис. 3 представлены данные накопления абсолютно сухой биомассы исследуемыми штаммами *I. lacteus*. Установлено, что активный рост базидиомицетов приходится на 5–25 сут. Экспоненциальная фаза роста мицелия наблюдается на 5–15 сут культивирования. Именно в этот период происходит значительное повышение молокосвёртывающей активности культуральной жидкости штаммов *I. lacteus*. Для штаммов 2421, 2422, 2423

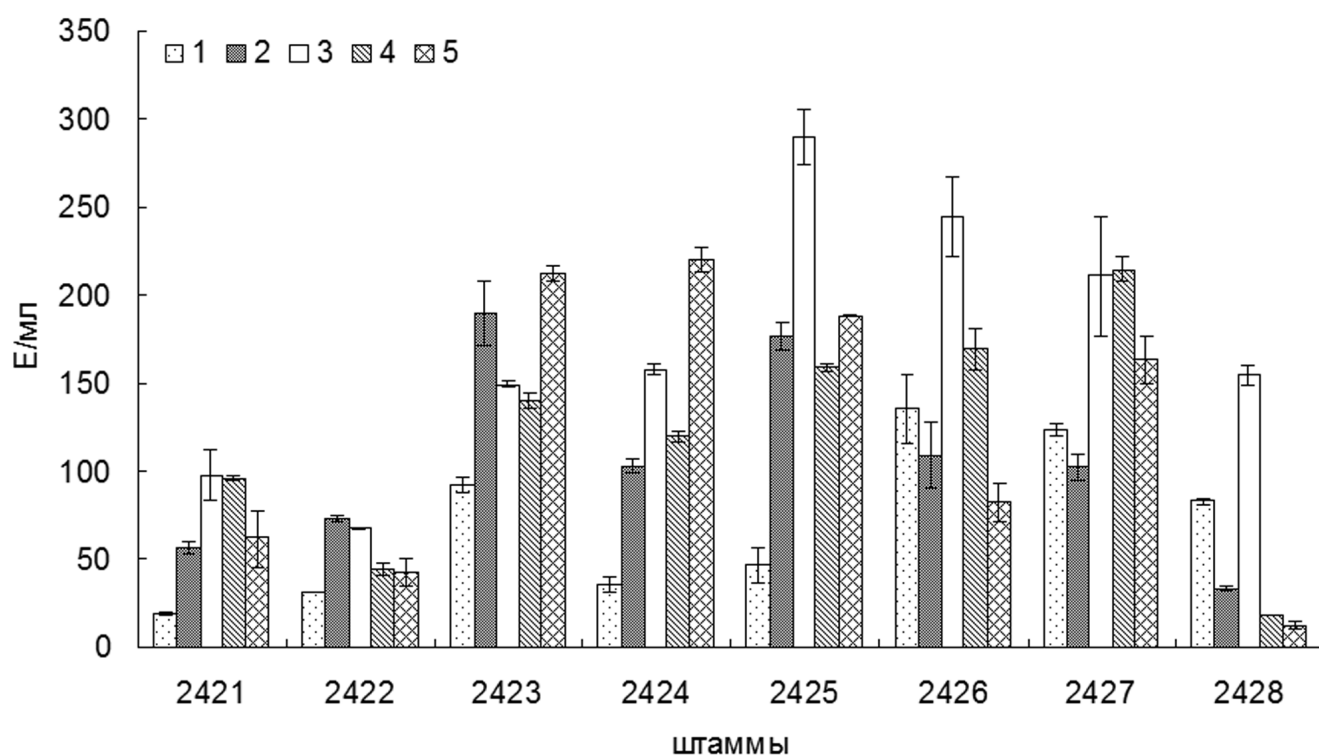


Рис. 1. Молокосвертывающая активность культуральной жидкости штаммов *Irpex lacteus*:
1 — 5-е сутки, 2 — 10-е сутки, 3 — 15-е сутки, 4 — 20-е сутки, 5 — 25-е сутки

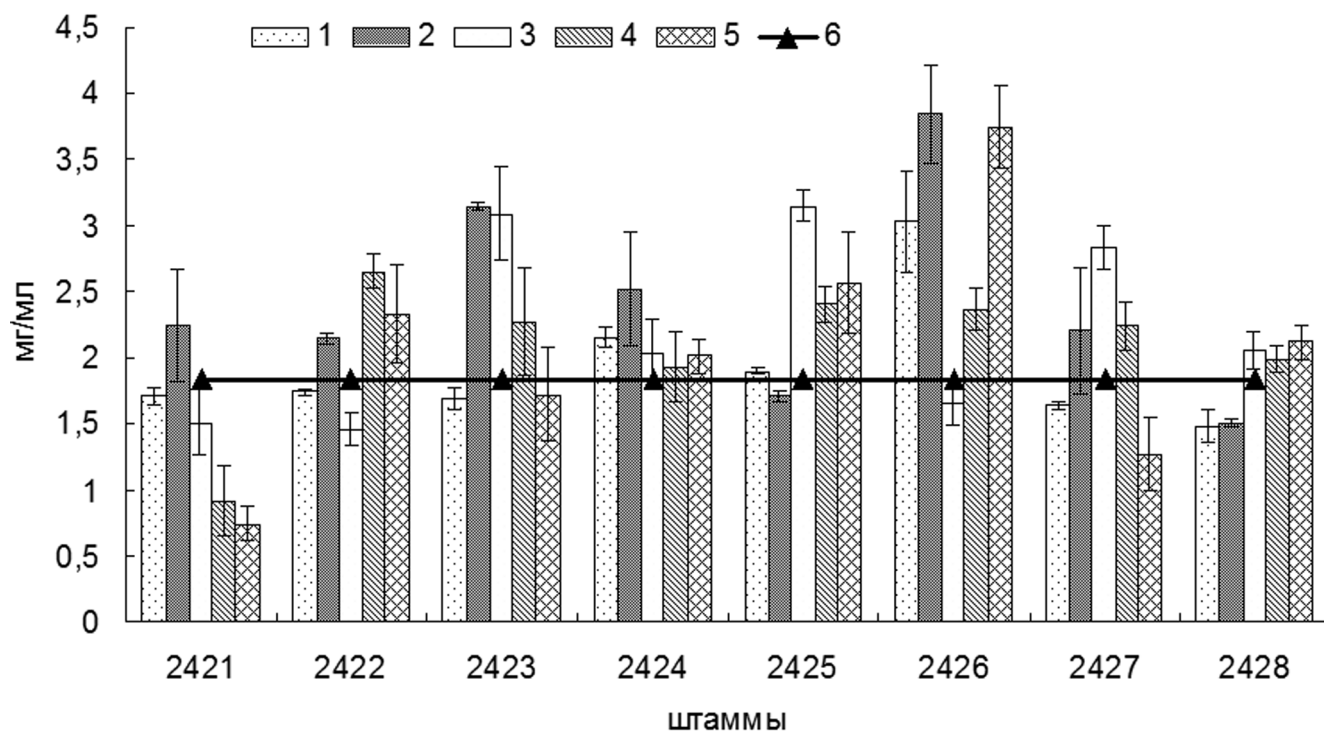


Рис. 2. Содержание белка в культуральной жидкости штаммов *Irpex lacteus*:
1 — 5-е сутки, 2 — 10-е сутки, 3 — 15-е сутки, 4 — 20-е сутки, 5 — 25-е сутки, 6 — контроль

характерен выход на стационарную фазу роста базидиомицета на 10-е сут. Для штаммов 2424 и 2428 *I. lacteus* на 25-е сут культивирования наблюдается достоверное уменьшение накопления биомассы, что указывает на процессы автолиза. Также было установлено, что в процессе культивирования

штаммов *I. lacteus* pH культуральной жидкости незначительно смещается в слабокислую сторону — к значениям 5,0, что, вероятно, связано с выделением в преобладающем количестве метаболитов со слабощелочными свойствами. Необходимо отметить, что высокий выход биомассы изученных

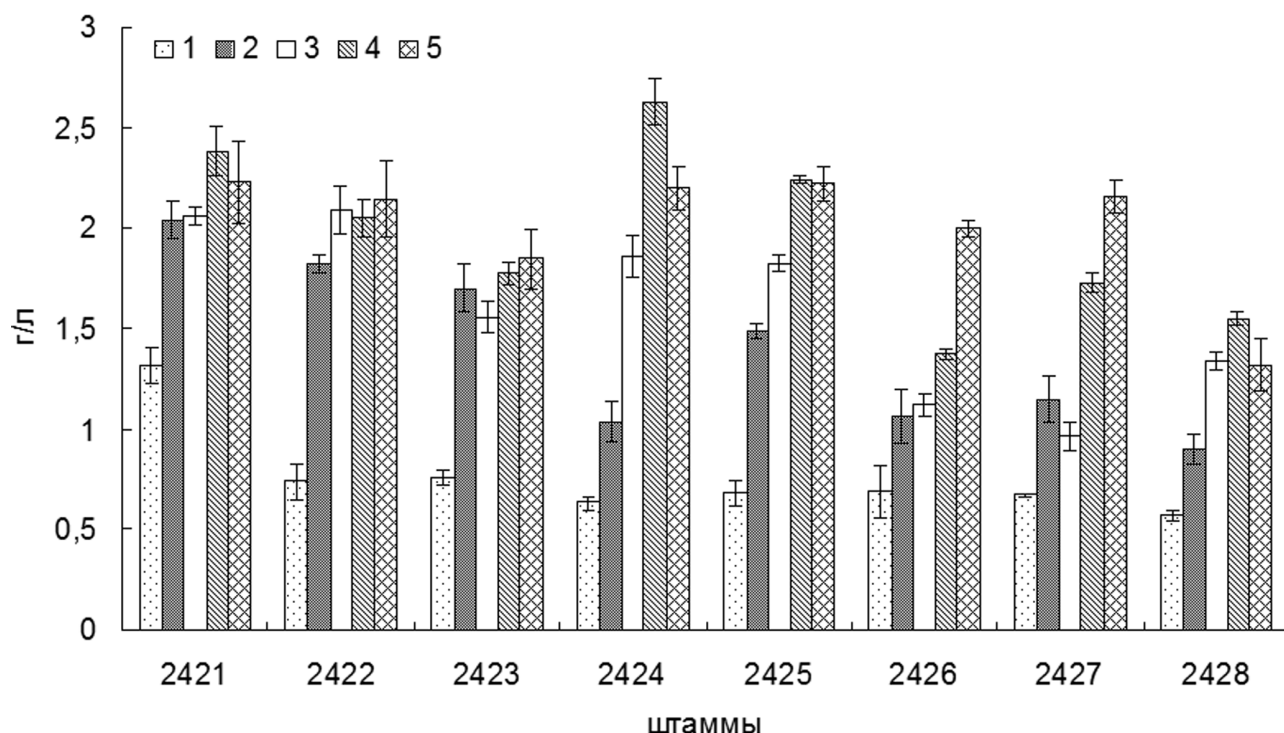


Рис. 3. Накопление абсолютно сухой биомассы штаммами *Irpex lacteus*:
1 — 5-е сутки, 2 — 10-е сутки, 3 — 15-е сутки, 4 — 20-е сутки, 5 — 25-е сутки

штаммов не совпадает с максимальными значениями молокосвёртывающей активности культуральной жидкости.

Таким образом, исследованные штаммы *I. lacteus* проявляют индивидуальные особенности синтеза экзопроотеиназ сычужного действия. При этом среди 8 штаммов гриба наиболее активными продуцентами молокосвёртывающего фермента являются штаммы гриба *I. lacteus* 2425, 2426 и 2427, поэтому они представляют теоретический и практический интерес для дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waderkar R.V., North M.J., Watkinson S.C. Proteolytic activities in two wood-decaying basidiomycetes fungi, *Serpula lacrimans* and *Coriolus versicolor* // Microbiology. 1995. Vol. 141. N 7. P. 1575–1583.
2. Sabotić J., Trček T., Popović T., Brzin J. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity // J. Biotechnol. 2007. Vol. 128. N 2. P. 297–307.
3. Kudryavtseva O.A., Dunaevsky Ya.E., Kamzolkina O.V., Belozersky M.A. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xilotrophic basidiomycetes // Microbiology. 2008. Vol. 77. N 6. P. 643–653.
4. Nakamura M., Iketani A., Shioi Yu. A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates // Microscience. 2011. Vol. 52. N 4. P. 234–241.
5. Kobayashi H., Kusakabe I., Murakami K. Milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* as a calf rennet substitute for cheddar cheese manufacture // Agric. Biol. Chem. 1985. Vol. 49. N 6. P. 1605–1609.
6. Kikuchi E., Kobayashi H., Kusakabe I., Murakami K. Suitability of milk clotting enzyme from *Irpex lacteus* for gouda cheese manufacture // Jpn. J. Zootech. Sci. 1988. Vol. 59. N 6. P. 532–540.
7. Nerud F., Mišurkova Z., Muzilek V. Production of milk-clotting enzymes by basidiomycetes // Folia Microbiol. 1989. Vol. 34. N 4. P. 310–315.
8. Kobayashi H., Kim H., Iton T., Kasamo K., Kusakabe I., Murakami K. Screening for milk-clotting enzymes from basidiomycetes // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. Vol. 58. N 2. P. 440–441.
9. Kawai M., Mukai N. Studies on milk clotting enzymes produced by basidiomycetes. I. Screening test of basidiomycetes for the production of milk clotting enzymes // Agric. Biol. Chem. 1970. Vol. 34. N 2. P. 159–163.
10. Kawai M. Studies on milk clotting enzymes produced by basidiomycetes. II. Some properties of basidiomycete milk clotting enzyme // Agr. Biol. Chem. 1970. Vol. 34. N 2. P. 164–169.
11. Okamura-Matsui T., Takemura K., Sera M., Takeno T., Hiroko H., Fukuda Sh., Ohsugi M. Characteristics of a cheese-like food produced by fermentation of the mushroom *Schizophyllum commune* // J. Biosci. Bioeng. 2001. Vol. 92. N 1. P. 30–32.
12. Kobayashi H., Kasamo K. Crystalization and preliminary X-ray diffraction studies of aspartic proteinase from *Irpex lacteus* // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 226. N 4. P. 1291–1293.

13. Lebedeva G.V., Proskuryakov M.T. Purification and characterization of milk-clotting enzymes from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm) // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. Vol. 45. N 6. P. 623–625.

14. Dmitriyeva T., Korchmaryova A., Denisova N., Shamt-syan M. Milk-clotting enzymes of higher basidiomycetes // Biotechnology: state of the art and prospects for development / Eds. G.E. Zaikov. N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2008. P. 49–57.

15. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.

16. Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins // Methods Enzymol. 1957. Vol. 3. P. 447–455.

17. Приєдський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: навч. Посібник. Донецьк: Кассіопея, 1999. 210 с.

Поступила в редакцию 19.07.2016

Принята в печать 26.08.2016

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

VARIABILITY OF STRAINS OF BASIDIOMYCETES *IRPEX LACTEUS* TO SYNTHESIS OF SPECIFIC MILK-CLOTTING PROTEINASES

O.V. Chemeris, V.V. Rashevskiy, K.A. Galkova, M.I. Boyko*

Department of Plant Physiology, School of Biology, SEI HPE "Donetsk National University", Shchorsa ul. 46, Donetsk, 83050, Ukraine

**e-mail: chemeris07@rambler.ru*

The ability to synthesize of milk-clotting (rennet) proteinase in 8 strains basidiomycetes *I. lacteus* was studied. It is found that the investigated strains of *I. lacteus* differ in enzyme activity of the culture liquid. Maximum milk-clotting activity of strains *I. lacteus* 2425, 2426 and 2427 was observed in the exponential growth phase on the 15th day of cultivation on glucose-peptone medium. These strains of *I. lacteus* are the most perspective producers of the milk-clotting enzymes for further research and practical application. Strains of *I. lacteus* 2421, 2422, 2423, 2424 and 2428 showed lower values of enzymatic activity and require additional research on the selection of the optimal culture conditions.

Keywords: *basidial fungus Irpex lacteus, strains, milk-clotting (rennet) activity, exoproteinases, producer, cultural filtrate.*

Сведения об авторах

Чемерис Оксана Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии растений биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет». Тел. +38 (062) 302-09-93; e-mail: chemeris07@rambler.ru

Рашевский Владислав Вадимович — студент биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет». Тел. +38 (062) 302-09-93; e-mail: vladdomein@mail.ru

Галкова Кристина Анатольевна — студент биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет». Тел. +38 (062) 302-09-93; e-mail: kristi.galkova@yandex.ua

Бойко Михаил Иванович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии растений биологического факультета ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет». Тел. +38 (062) 302-09-93; e-mail: prof_bmi@mail.ru

ЭКОЛОГИЯ

УДК: 574.64+ 628.161.1

ОЦЕНКА СВОЙСТВ ФЕРРАТА КАЛИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДЫ, МЕТОДОМ БАКТЕРИАЛЬНОГО БИОТЕСТИРОВАНИЯ

А.П. Зарубина¹, Ю.Д. Перфильев², Е.В. Сорокина^{1,*}, А.И. Нетрусов¹

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

² кафедра радиохимии, химический факультет, Московский государственный имени М.В. Ломоносова; 119234, г. Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 10

*e-mail: sorokina_ev77@mail.ru

Биотестированием на модели бактериальной люминесценции в течение 30 мин исследованы характеристики четырёх природных образцов воды городской и сельской среды и эффективность их очистки новым реагентом — ферратом калия K_2FeO_4 . Выявлено, что два образца воды, взятых в городской местности, были токсичны, а два других (один из городской и один из сельской среды) — нетоксичны. Многочисленные данные по нарастанию показателя индекса токсичности во времени, полученные этим методом, позволили судить о химической природе веществ, содержащихся в исследуемых образцах воды. Токсичные природные образцы воды, вероятно, содержали тяжёлые металлы и хорошо очищались ферратом калия, одним из механизмов действия которого является их адсорбция. В нетоксичных исследуемых природных образцах воды при внесении в них феррата калия, вероятно, были образованы токсичные комплексы с органическими соединениями, содержащимися в воде. Данные ориентируют на дальнейшие исследования свойств феррата калия при комплексообразовании его с органическими соединениями. Биотестирование на основе бактериальной люминесценции является перспективным экспресс — методом для оценки свойств различных источников воды (их интегральной токсичности и предположительного химического состава), а также характеристик новых реагентов для их очистки (эффективных концентраций, бактерицидности и механизмов действия во взаимосвязи с тяжёлыми металлами и органическими веществами воды).

Ключевые слова: биотестирование, бактериальная люминесценция, реагент очистки воды, феррат калия, токсичность воды.

Очистка как питьевой, так и промышленно-технической (отходы производства тяжёлых металлов, промышленные аварии, природные катаклизмы и пр.) воды является научной и практической проблемой. Широко используют биологические методы очистки воды от биоразлагаемых органических веществ, соединений азота, фосфора, серы и др., но они недостаточно активны при загрязнении грунтовых вод диоксинами и их производными, фосфонатными пестицидами, добавками к бензину и т.д. [1]. На биологических станциях очистки воды не всегда подвергаются уничтожению микроорганизмы, компоненты средств гигиены человека, бытовой химии, фармацевтических препаратов и проч. Они представляют опасность, обладая патогенным, канцерогенным или мутагенным действием. Для очистки воды используют хлор, гипохлорит натрия, диоксид хлора, озон, перекись водорода, реактив Фентона и др. Одни из них загрязняют окружающую среду хлором, другие могут приводить к образованию более токсичных продуктов, чем исходные поллютанты, а газообразные окислители ограничены объемами источников воды. Перспективным методом очистки воды является применение ферратов, щелочных металлов много-

функционального действия [2]. Ферраты (VI), обладая окисляющим и дезинфицирующим действием, разлагают многие токсичные химические вещества до малотоксичных продуктов и вызывают гибель микроорганизмов. Продуктом разложения ферратов в растворе является малотоксичный гидроксид железа, который выделяется в виде коллоидных агрегатов с очень развитой поверхностью, адсорбирующих ионы тяжелых металлов и частицы органических остатков. Их коагулирующее действие обеспечивает дополнительную очистку воды путём сорбции многих поллютантов. Эффективность ферратов для очистки воды показана на примере таких промышленных отходов, как сероводород, аммиак, цианиды и тиоцианаты, тиоацетамид и тиомочевина и др. В настоящее время активно проводятся исследования физико-химических свойств ферратов (VI) и синтезируются новые препараты, в частности, феррат калия [3, 4]. Для разработки технологии применения ферратов в целях очистки воды в промышленном масштабе принципиально важна характеристика их токсикологических свойств с выбором удобных объектов биотестирования. В связи с этим метод биотестирования на основе бактериальной люминесценции успешно зареко-

мендовал себя в экспресс-оценке действия физических факторов, химических веществ и их смесей, в экологическом мониторинге объектов окружающей среды [5–7].

В данной работе на примере образцов воды городской и сельской среды с использованием экспресс-метода на основе бактериальной люминесценции исследованы некоторые свойства реагента химической очистки воды, феррата калия — K_2FeO_4 (эффективные концентрации, предположительный механизм взаимодействия с природными загрязнителями воды, бактерицидные свойства).

Материалы и методы

Биотестирование осуществляли с использованием генно-инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 с созданным светящимся фенотипом, обеспеченным встроенным lux-опероном морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* 54D10. Штамм получен и хранится на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и известен как биосенсор тест-системы “Эколом-06” [8]. В биотестировании использовали лиофильновысушенные клетки бактерий после регидратации в течение 30 мин в 10 мл охлажденной стерильной дистиллированной воды (рН 7,4) и разведении до стандартных суспензий.

Плотность бактериальных суспензий определяли нефелометрически ($\lambda = 670$ нм) на фотоколориметре KF77 (Польша) и выражали числом клеток в 1 мл (кл/мл) на калибровочной кривой.

Определение рН водных образцов осуществляли потенциометрически.

Используемый реагент для очистки воды феррат калия получен в лаборатории ядерно-химических методов кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, содержание $K_2FeO_4 > 95\%$ [3].

Природные образцы воды отбирали из сельских и городских источников в ранний весенний период: 1 — исходный образец воды из реки Десны в бассейне реки Москвы и аналогичный образец воды после внесения феррата калия до концентрации 21,6 мкг/мл; 2 — исходный образец воды из ручья на суглинистой почве в Хорошевском районе города Москвы, 2 — аналогичный образец воды после внесения феррата калия до концентрации 44,8 мкг/мл; 3 — исходный образец воды из ручья в чернозёмном сельском районе около города Истра, 3 — аналогичный образец воды после внесения феррата калия в концентрации 32 мкг/мл; 4а — исходный образец смеси снега и воды, взятый в районе МГУ имени М.В. Ломоносова, 4б — аналогичный образец воды после внесения феррата калия в концентрации 51,2 мкг/мл. Образцы тщательно перемешивали и до биотестирования хранили в течение двух недель при комнатной температуре (18–20°C). Выбор природных водных образцов, время их хранения и использование концентраций феррата калия для обработки выбраны произ-

вольно. При этом исходили из возможности оценить эффективность вносимых концентраций и стабильность бактерицидных свойств реагента очистки воды.

Интенсивность свечения бактерий (в имп/сек) регистрировали с помощью люминометра “Биотокс-6МС” (Россия).

Измерение интегральной токсичности исходных образцов воды и аналогичных параллельных образцов воды с ферратом калия после их одинакового хранения проводили при комнатной температуре (20°C) в течение 5, 15 и 30 мин. В пробирки (объёмом 1,5 мл) наливали 0,1 мл суспензии клеток бактерий и 0,9 мл исследуемого раствора воды. В исследуемые и контрольные образцы вносили $6,5 \cdot 10^7$ клеток биосенсора/мл.

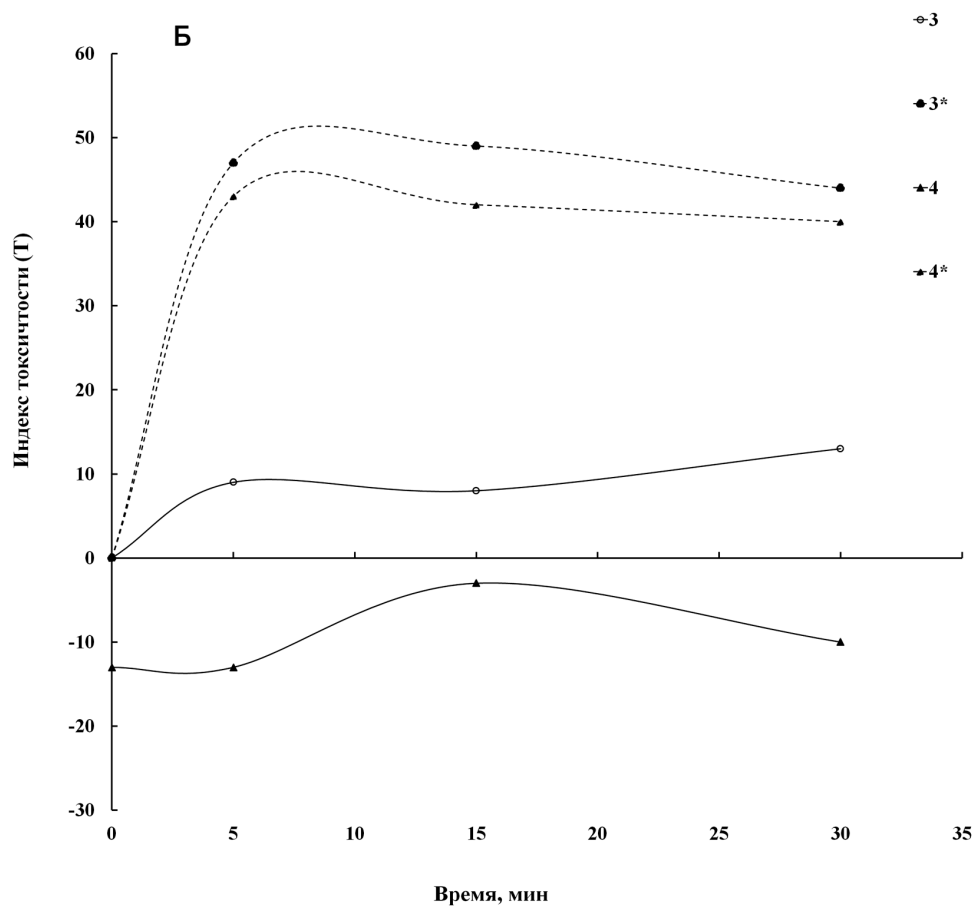
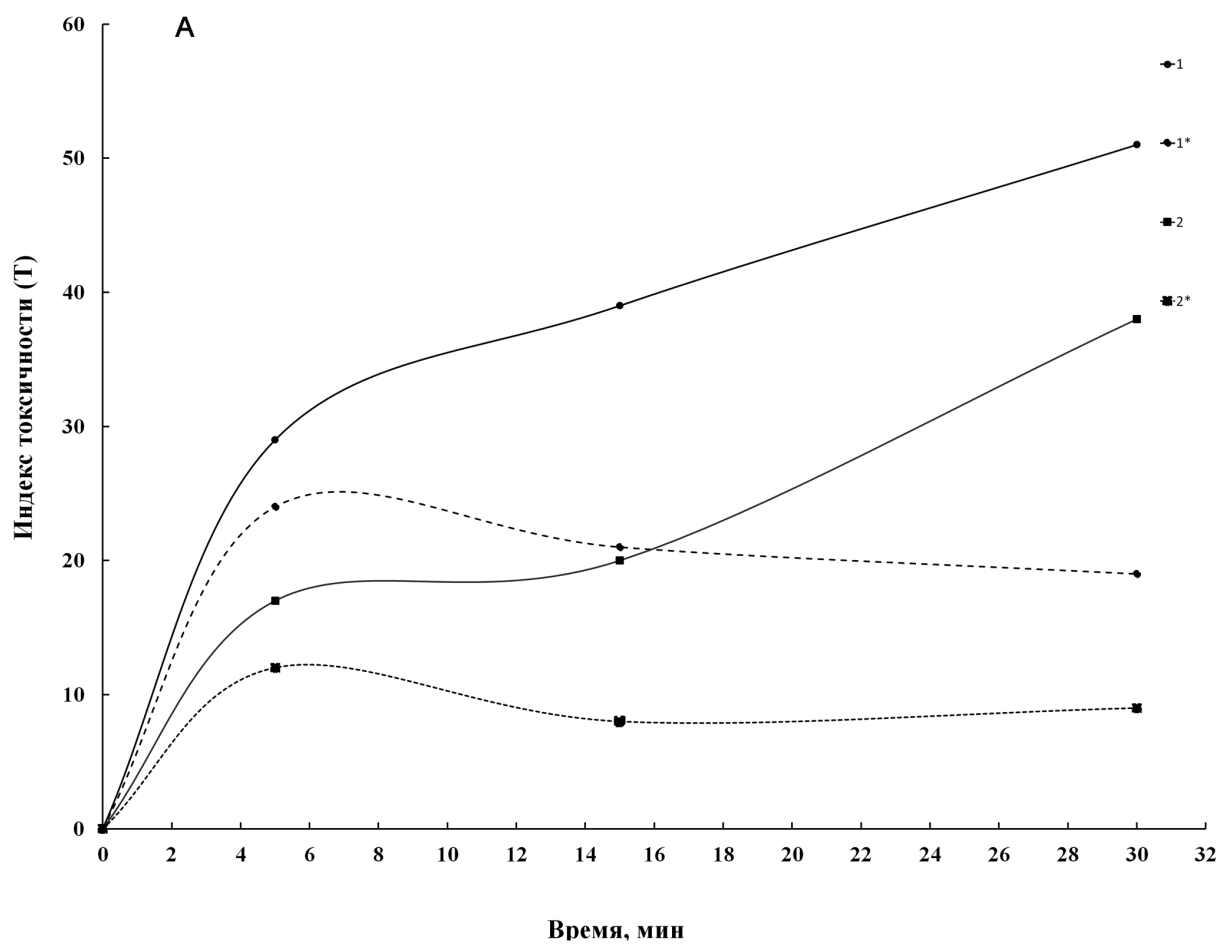
Все исследуемые образцы воды оценивали в двух вариантах эксперимента, отличающихся контролями. В первом варианте использовали один общий контроль (К), содержащий 0,1 мл суспензии клеток бактерий и 0,9 мл дистиллированной воды. К каждому опытному образцу (О) добавляли 0,1 мл суспензии клеток бактерий и 0,9 мл исследуемого раствора как с ферратом калия, так и без него. Во втором варианте оценивали непосредственно вклад реагента в очистку воды в используемых концентрациях. В контрольную пробирку вносили 0,1 мл суспензии клеток биосенсора и 0,9 мл исследуемой воды. Опытные образцы были аналогичны контрольным, но с ферратом калия. Анализ осуществляли при фиксированном времени экспозиции каждого контрольного и опытного образца воды, одновременно регистрируя их интенсивность люминесценции в трёх повторностях.

Индекс токсичности (Т) во времени взаимодействия биосенсора с исследуемым образцом воды определялся автоматически на люминометре “Биотокс” по формуле: $T = 100 \cdot (I_k - I)/I_k$, где I_k и I — интенсивность свечения контроля и опыта, соответственно. Оценку токсичности классифицировали по трём группам: величина $T < 20$ — образец нетоксичен; $T > 20$, но < 50 — образец токсичен; $T > 50$ — образец очень токсичен. Иногда наблюдали стимуляцию свечения тест-организма, т.е. величина Т с отрицательным знаком.

Бактерицидные свойства феррата калия, содержащегося в образцах воды — 1, 2, 3 и 4, оценивали по выживаемости светящихся клеток бактерий (по числу КОЕ — колониеобразующих единиц), выросших на агаризованной среде LB (Лурия-Бертани) со 100 мкг/мл ампициллина в течение 24 ч при 32°C. Исследовали образцы воды, обработанные ферратом калия, после двух недель их хранения и биотестирования (30 мин).

Результаты и обсуждение

Феррат калия, известный как сильный окислитель, через 14 сут хранения в природных образцах воды утратил дезинфицирующие свойства. В об-



разцах воды (1–4), предварительно обработанных этим реагентом, через 30 мин взаимодействия с клетками светящихся грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* K12 TG1 наблюдали сохранение их жизнеспособности (по числу КОЕ).

Все образцы воды (исходные и опытные) имели рН 7,0–7,4, что соответствовало рекомендациям использования данного метода биотестирования [8].

Результаты данных оценки токсичности природных образцов воды (1–4) и аналогичных образцов воды, обработанных ферратом калия, отражены на рис. 1. Т исходных образцов воды 1 и 2 к 30 мин анализа составляли 50 и 40, соответственно, т.е. выявлена их токсичность. Феррат калия в концентрациях 21,6 мкг/мл и 44,8 мкг/мл очистил образцы воды 1 и 2, соответственно, которые стали нетоксичными (рис.1). По характеру увеличения Т с возрастанием времени биотестирования (5, 15, 30 мин) можно предполагать, что исходные образцы воды 1 и 2 содержали тяжёлые металлы [8]. Одним из механизмов действия феррата калия, как реагента очистки воды, является адсорбция тяжёлых металлов продуктом разложения ферратов — гидроксидом железа [2]. На основании известных литературных и полученных нами данных можно предположить, что природные образцы воды 1 и 2 были загрязнены тяжёлыми металлами и очищены по известному механизму действия феррата калия, адсорбирующего тяжёлые металлы. Нами было выявлено, что природные образцы воды 3 и 4 нетоксичны. Образец воды 4 вызывал незначительную (величина $T \approx -10$) стимуляцию свечения биосенсора (рис. 1). Однако нетоксичные образцы воды 3 и 4 в аналогичных образцах 3 и 4, обработанных ферратом калия в концентрациях 32,0 мкг/мл и 51,2 мкг/мл, соответственно, стали токсичными (величины $T \approx 40$). Показатели токсичности этих образцов воды практически не менялись в течение 30 мин (рис. 1), что может косвенно свидетельствовать о наличии в них веществ органической природы [8]. Токсичность образцов воды 3 и 4, обработанных ферратом калия, вероятно, вызвана взаимодействием токсичного соединения реагента с веществами органической природы, содержащимися в исходных нетоксичных образцах (рис. 1).

Непосредственное действие феррата калия на исследуемые образцы воды (вклад в токсичность) выявляли во втором варианте эксперимента, используя в качестве каждого контрольного образца (К) природный воды к каждому аналогичному опытному, обработанному ферратом калия (рис. 2). Феррат калия в образцах воды 1 и 2 чётко проявляет

себя как реагент очистки воды от загрязнителей природных образцов. При этом наблюдали стимуляцию интенсивности свечения тест-объекта (рис. 2). Нужно отметить факт проявления токсичности воды (образцы 3 и 4) после обработки ферратом калия (рис. 1). При этом выявлено, что сам феррат калия в концентрации 32 мкг/мл не оказывает непосредственного действия на токсичность воды образца 3 (рис. 2). Токсичность воды, очевидно, вызывает образованный комплекс реагента с каким-либо органическим веществом, содержащимся в этом природном образце воды (рис. 1). Токсичность образца воды 4, обработанном ферратом калия в концентрации 51,2 мкг/мл, возможно, связана как с действием реагента, образующего токсическое соединение с органическим соединением этой природной воды, так и с избыточным количеством реагента (рис. 2). При этом наблюдаем непосредственное незначительное влияние именно феррата калия в образце 4 ($T \approx 45$ — рис. 1 и $T \approx 30$ — рис. 2). На рис. 2 видно, что феррат калия вызывает стимуляцию свечения бактериального биосенсора (за исключением случая с образцом 4).

Стимуляция интенсивности люминесценции у светящихся бактерий при действии многих веществ в низких концентрациях отмечена ранее многими авторами [9]. Механизм стимуляции не ясен, что затрудняет интерпретацию результатов. При этом в рекомендациях к анализам при биотестировании на основе бактериальной люминесценции предлагают делать вывод об отсутствии токсичности исследуемых образцов [8]. Однако при действии веществ, приводящем к значительному стимулированию интенсивности свечения бактериального биотеста, стимуляция функционирования их люминесцентной системы может быть связана с конкуренцией их дыхательной системы за восстановленный флавин. Вследствие этого происходит подавление транспорта электронов в дыхательной цепи соответственно, поток электронов в этой цепи снижается, эквивалентно возрастая в цепи люминесцентной системы. В результате интенсивность биолюминесценции повышается, а регистрируемый в этот момент Т приобретает отрицательное значение [9]. Следует отметить, что широко известно понятие гормезиса, когда различные вещества в малой концентрации, действуя на некоторые функции организма, вызывают стимуляцию разных функций [10]. Некоторые исследователи считают нетоксичным стимулирующее действие ксенобиотиков до уровня 30% [11].

Таким образом, биотестирование в течение 30 мин с использованием тест-системы на основе бактериальной люминесценции позволило выявить

Рис. 1. Оценка индекса токсичности природных образцов воды (1–4) и аналогичных образцов воды, обработанных ферратом калия (1*–4*), с использованием тест-системы на основе бактериальной люминесценции. В качестве контрольного образца — дистиллированная вода. *Обозначения.* Образцы воды: 1 — из реки Десны; 2 — из ручья на суглинистой почве Хорошевского района города Москвы; 3 — из ручья в чернозёмном сельском районе около города Истра, 4 — смесь снега и воды, взятая в районе МГУ имени М.В. Ломоносова

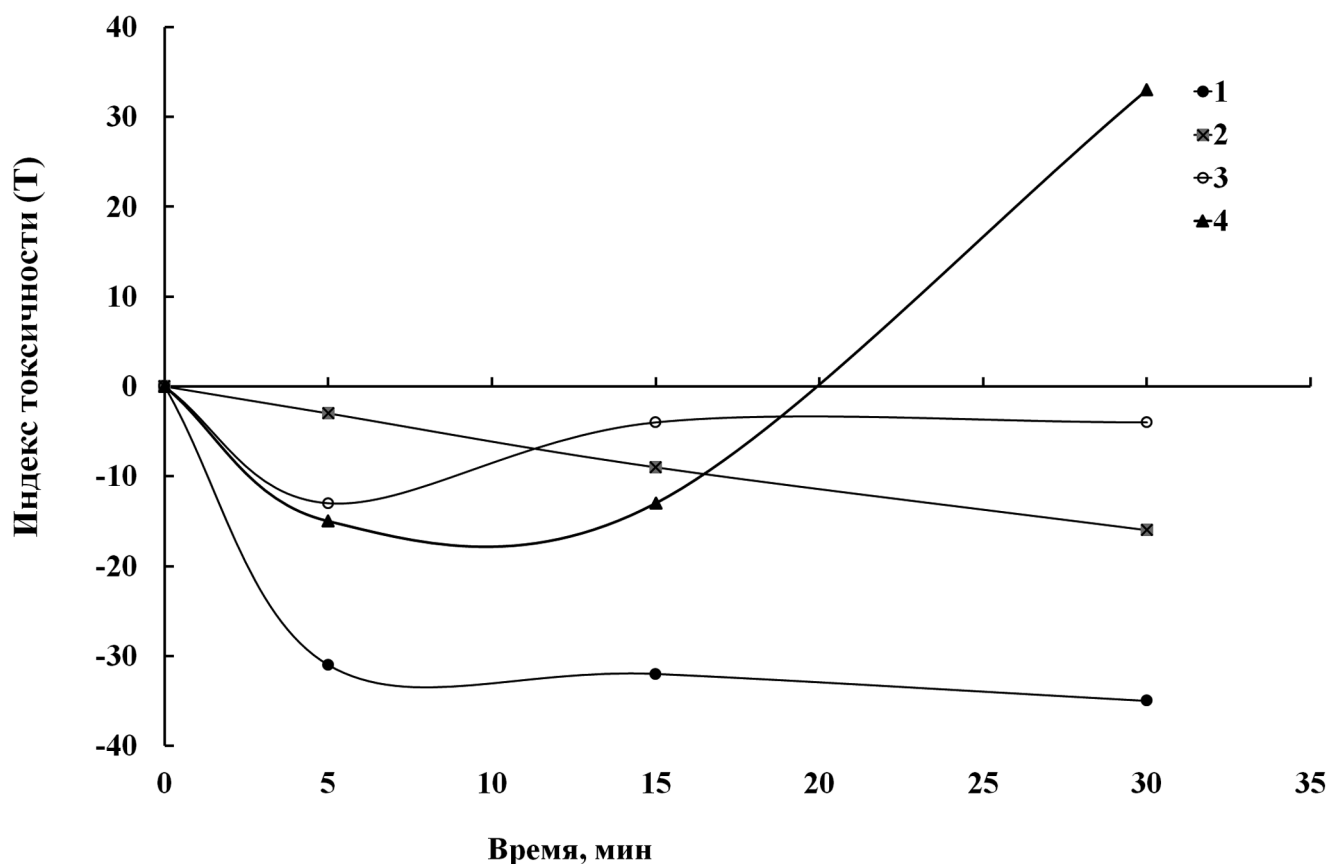


Рис. 2. Непосредственный вклад феррата калия при оценке индекса токсичности каждого образца воды (1–4). В качестве контрольного образца — аналогичные природные образцы воды без феррата калия. Обозначения: Образцы воды, обработанные ферратом калия: 1 — из реки Десны; 2 — из ручья на суглинистой почве Хорошевского района города Москвы; 3 — из ручья в чернозёмном сельском районе около города Истра, 4 — смесь снега и воды, взятая в районе МГУ имени М.В. Ломоносова

качество исследуемой природной воды (токсичность, химический состав предполагаемых веществ) и изучить некоторые свойства феррата калия (активные концентрации, время хранения, возможный механизм его действия как реагента очистки воды, в зависимости от химического состава воды). Данные могут ориентировать исследователей на изучение особенностей комплексообразования феррата калия с органическими веществами. Биотестирования на основе бактериальной люминесценции можно рассматривать как перспективный экспресс-метод для сравнения различных реагентов очистки воды, подбора эффективных концентраций и оценки стабильности и времени обработки исследуемый образцов.

В заключение мы хотели бы отметить достоинство используемого метода биотестирования на основе бактериальной люминесценции. Основными преимуществами люминесцентного бактериального теста перед другими биотестами являются:

- быстрота (время анализа 5–30 мин);
- хорошая корреляция результатов анализов с данными других биотестов. Показатель острой токсичности EC_{50} (концентрация ксенобиотика при тушении интенсивности люминесценции бактерий на 50%) имеет коэффициент корреляции с LD_{50} для эукариотных биотестов от 0,8 до 0,95 [7];

- малый объем анализируемого образца (1–0,1 мл и менее); точность и воспроизводимость результатов (ошибка не более 10%);

- оценка метаболического статуса бактериальной клетки как характеристики целостного организма, а не только показателя функционирования люминесцентной системы;

- автоматическое определение Т исследуемых ксенобиотиков с помощью современных люминометров;

- удобство и простота анализа (небольшое число подготовительных операций, автоматическое определение Т в люминометре);

- стабильность и стандартность лиофильно высушенных клеток биотеста;

- безвредность технологии;

- выяснение характера токсического действия ксенобиотика (временный или постоянный эффекты);

- выявление аккумулирующего, аддитивного или синергетического действия двух и более ксенобиотиков;

- определение химической природы образца. По характеру изменения Т в процессе биотестирования (5, 15, 30 мин) можно делать предположение о химической природе исследуемого образца (тяжёлые металлы приводят к резкому возрастанию

токсичности, у органических соединений токсичность возрастает постепенно с последующей стабилизацией или с некоторым их снижением);

— доступность и экономичность оценки действия физических факторов (например, биологические эффекты действия ионизирующей радиации, нетеплового электромагнитного излучения) и токсичности химических веществ, а также их смесей;

— широкая возможность проведения анализа и санитарно-гигиенического контроля в лабораторных и полевых условиях для регулярного мониторинга в режиме реального времени или в системе on-line как отдельных образцов, так и объектов окружающей среды (воды, почвы, воздуха);

— использование как модельных организмов с более широкой возможностью изучения свойств используемых ксенобиотиков и механизмов действия на биологические системы [9, 12].

Значительное тушение люминесценции бактерий при действии на них токсичных ксенобиотиков свидетельствует о рисках их использования. Однако связь гибели бактерий действия ксенобиотика с его значительной токсичностью (полное тушение люминесценции) наблюдают лишь в случае потери жизнеспособности бактерий (мёртвые бактерии не люминесцируют) и проверяют дополнительными микробиологическими методами [13, 14, 15].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хенце М., Армозс П., Лякуржансен Й., Арван Э. Очистка сточных вод. Биологические и химические процессы. М.: Изд-во Мир, 2004. 471 с.

2. Jiang J.-Q., Lloyd B. Progress in the development and use of ferrate(VI) salt as an oxidant and coagulant for water and wastewater treatment // Water Res. 2002. Vol. 36. N 6. P. 1397–1408.

3. Perfiliev Yu.D. Mossbauer spectroscopy of iron in high oxidation states // Russ. J. Inorg. Chem. 2002. Vol. 47. N 5. P. 611–619.

4. Mácová Z., Bouzek K., Híveš J., Sharma V.K., Terryn R.J., Baum J.C. Research progress in the electrochemical synthesis of ferrate (VI) // Electrochim. Acta. 2009. Vol. 54. N 10. P. 2673–2683.

5. Zarubina A.P., Gapochka M.G., Novoselova L.A., Gapochka L.D. Effect of low intensity electromagnetic radiation on the toxicity of domestic wastewater tested with the “Ecolum” test system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 1. P. 49–52.

6. Зарубина А.П., Сорокина Е.В. Первый среди равных. Один из самых экспрессных и доступных методов биотестирования бактериальный люминесцентный тест // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). Биология. 2015. Т. 17. № 8. С. 161–163.

7. Kaiser K. L. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms // Environ. Health Perspect. 1998. Vol. 106. N 2. P. 583–591.

8. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьёва Л.Н., Карташёв Ф.В., Завильгельский Г.Б. Сенсорные биолуминесцентные системы на основе lux-

В ряде стран сертифицированы тест-системы на основе бактериальной люминесценции под разными торговыми марками. В России сертифицирован тест с использованием морских люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum* [16]. На основе природных морских светящихся бактерий и генно-инженерных штаммов *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными в них lux-оперонами из разных природных светящихся бактерий получены биосенсоры тест-систем “Эколюм” [8]. Генно-инженерные биотесты этих люминесцентных бактерий с созданным светящимся фенотипом позволяют проводить анализ без осмопротектора (раствора NaCl) и при более высоких температурах (до 37°C), чем используемые биотесты морских светящихся бактерий (15°C). Методики измерений интегральной токсичности воды, почв, воздушной среды, химических материалов и изделий с помощью тест-системы “Эколюм” имеют свидетельство о метрологической аттестации (4/7-93), зарегистрированы в Департаменте Госсанэпиднадзора РФ (№ 11-1/131-09, 11-1/132-09, 11-1/133-09, 11-1/134-09) и Госкомэкологии — сертификат Госстандарта России № 01.19.231/2001. Они внедрены на территории РФ в природоохранных организациях, органах санитарно-эпидемиологического надзора и ориентированы на использование реактивов и оборудования отечественного производства.

оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2002. № 3. С. 20–24.

9. Zarubina A.P., Deev L.I., Parkhomenko I.M., Parshina E.Yu., Saryicheva A.S., Novoselova L.A., Lukashev E.P., Netrusov A.I., Rubin A.B. Evaluation of toxicity of argentic ions and nanoparticles on the model bacterial object with luminescent phenotype // Nanotechnol. Russ. 2015. Vol. 10. N 5–6. P. 475–4831.

10. Филенко О.Ф. Динамика эффекта загрязняющих веществ в экотоксикологии // Токсикол. вестн. 2001. № 2. С. 2–6.

11. Саксонов М.Н., Балаян А.Э., Таран Д.О., Бархатова О.А. Влияние ряда токсикантов на флуоресценцию хлорофилла клеток водорослей и возможность его ослабления гуматами // Материалы IV Всерос. конф. по вод. экотоксикологии, посвящ. памяти Б.А. Флерова “Антропогенное влияние на вод. организмы и экосистемы” / Ин-т биологии внут. вод им. И.Д. Папанина. Борок, 2011. С. 207–209.

12. Backhaus T., Grimme L. H. The toxicity of antibiotic agents with aid of intact luminous bacterium *Vibrio fischeri* // Chemosphere. 1999. Vol. 38. N 14. P. 3291–3301.

13. Jassim S.A., Ellison A., Denyer S.P., Stewart G.S. In vivo bioluminescence: a cellular reporter for research and industry // Biolum. Chemilum. 1990. Vol. 5. N 2. P. 115–122.

14. Пархоменко И.М., Зарубина А.П., Лукашев Е.П., Странадоко Е.Ф., Тимофеев К.Н., Рубин А.Б. О механизмах фотодинамического действия сенсibilизаторов и усовершенствовании методов их первичного отбора для фотодинамической антимикробной терапии // Докл. РАН. 2005. Т. 404. N 6. С. 821–825.

15. Medvedeva S.E., Tyulkova N.A., Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria // Sib. Fed. Univ. Biol. J. 2009. Vol. 2. N 4. P. 418–452.

16. База нормативной документации complexdoc.ru [Электронный ресурс]. 2001. URL: <http://aquariumok.ru> (дата обращения: 03.09.2016).

Поступила в редакцию 20.05.2016

Принята в печать 05.09.2016

ECOLOGY

EVALUATION OF PROPERTIES FERRATE POTASSIUM AS REAGENT WATER PURIFICATION USING THE METHOD BACTERIAL BIOLUMINESCENCE TESTING

A.P. Zarubina¹, Y.D. Perfiliev², E.V. Sorokina^{1,*}, A.I. Netrusov¹

¹ Department of Microbiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Department of Radiochemistry, School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–10, Moscow, 119234, Russia;

*e-mail: sorokina_ev77@mail.ru

Biotesting on bacterial luminescence model for 30 minutes investigated characteristics of four samples of natural water in urban and rural environment and the effectiveness of new purification agent — potassium ferrate K_2FeO_4 were studied. It was revealed that two samples of water from urban areas were toxic, while the other two (one from urban and one from rural environment) — are non-toxic. Numerous data received concerning the increase in the time toxicity index allow us to make reasonable conclusions about the chemical nature of substances containing in the test water samples. Toxic natural water samples is likely to contain heavy metals and are well cleaned potassium ferrate on the mechanism of their sorption by the product of ferrates degradation. In non-toxic natural water samples investigated under addition of potassium ferrate were probably formed complexes with the toxic organic compounds contained in water. These are oriented to further study the properties of potassium ferrate complexes with organic compounds. The bioassay based on the bacterial luminescence is a promising method for the rapid evaluation of the properties of various water sources (and their putative integral toxicity of the chemical composition), and cleaning them of new reagents (effective concentrations of bactericidal and mechanisms of action in connection with heavy metals and organic substances of the water).

Keywords: bioassay, bacterial luminescence, water purification agent, potassium ferrate, water toxicity.

Сведения об авторах

Зарубина Алевтина Петровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-03; e-mail: al-zar1@yandex.ru

Перфильев Юрий Дмитриевич — докт. хим. наук, вед. науч. сотр., проф. кафедры радиохимии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-34-68; e-mail: perf@radio.chem.msu.ru

Сорокина Елена Владимировна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-36; e-mail: sorokina_ev77@mail.ru

Нетрусов Александр Иванович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: anetrusov@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 575.174

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕТРАНСКРИБИРУЕМОГО СПЕЙСЕРА 5S-рДНК У *HIPPORHAE RHAMNOIDES* L.

О.С. Александров*, А.В. Евтухов, И.И. Киселёв, Г.И. Карлов

Центр молекулярной биотехнологии, Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева; Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Амплификация нетранскрибируемого спейсера 5S-рДНК облепихи крушиновидной (*Hipporhae rhamnoides* L.) с помощью праймеров, подобранных на фланги соседних кодирующих областей, показала наличие единичного фрагмента. Данный фрагмент был клонирован и секвенирован. Было обнаружено, что длина нетранскрибируемого спейсера облепихи составляет 807 п.о. Анализ последовательности показал высокий уровень гомологии с ранее описанными микросателлитными локусами облепихи, лоха серебристого (*Elaeagnus angustifolia* L.) и джугуна (*Calligonum mongolicum* Turcz.), включающими мотив (GA)_n. Полученные результаты могут быть полезны для дальнейшего изучения организации генов рибосомной РНК.

Ключевые слова: 5S-рДНК, нетранскрибируемый спейсер, микросателлитный локус, *Hipporhae rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Calligonum mongolicum* Turcz.

У большинства животных и семенных растений гены, кодирующие рибосомную РНК 5S-субъединицы, организованы в виде кластеров, состоящих из мономеров, располагающихся тандемно по принципу “голова-хвост” [1–3]. Каждый мономер включает в себя консервативную 120-нуклеотидную кодирующую область и нетранскрибируемый спейсер (NTS), длина и нуклеотидный состав которого, как правило, различаются у разных видов [4–6]. Полиморфизм NTS 5S-рДНК используют для филогенетических исследований, анализа гибридов и разработки видоспецифичных маркеров [7, 8]. Благодаря тому, что кодирующие участки кластеров 5S-рДНК консервативны, можно провести амплификацию NTS у широкого круга видов с помощью одной и той же пары праймеров, подобранной на фланги генов (рисунок). Часто используют системы праймеров, разработанные Пендасом и др. (1995); Брауном и Карлсоном (1997); Шмидтом (1994) [4, 9, 10].

Облепиха крушиновидная (*Hipporhae rhamnoides* L., 2n = 24) — двудомный многоствольный кустарник (реже дерево) семейства Elaeagnaceae, имеющий обширный ареал преимущественно в северном полушарии Евразии и использующийся в качестве плодовой и лекарственной культуры [11]. Для биологической науки это растение интересно тем, что в его кариотипе имеются половые хромосомы. Было показано, что обычно в паре половых хромосом Y-хромосома короче X-хромосомы. Однако среди генотипов *H. rhamnoides*, произрастающих на территории Румынии, встречаются такие, у которых Y-хромосома значительно длиннее X-хромосомы [12]. Молекулярно-генетическому и цитогенетическому изучению облепихи крушиновидной посвящено не так много работ. Известно, что размер ее

генома составляет $\sim 2,55 \times 10^9$ п.о./2C [13]. Для идентификации пола растений облепихи были предложены только маркеры на основе случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-маркеры). Также предпринимались попытки использования RAPD и других видов молекулярных маркеров для изучения полиморфизма облепихи [11].

Локусы 5S-рДНК у облепихи ещё не изучены. Данная работа является первым сообщением о последовательности NTS 5S-рДНК облепихи.

Материалы и методы

В работе использовались образцы облепихи крушиновидной сорта Ломоносовская, любезно предоставленные сектором дендрологии Ботанического сада МГУ. ДНК выделяли из молодых листьев облепихи согласно методике Дойл и Дойл 1990 [14]. Амплификацию NTS 5S-рДНК проводили на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США), используя систему праймеров 5S1/5S2 [8] и программу: 1) 94°C — 5 мин; 2) 30 циклов (94°C — 20 с, 60°C — 20 с, 72°C — 20 с.); 3) 72°C — 10 мин. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации осуществляли в 1,5%-ном агарозном геле при 5 В/см и фотографировали с помощью системы гель-документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Продукт полимеразной цепной реакции (ПЦР) очищали с помощью набора GenJet™ PCR Purification Kit (Fermentas, Латвия) и клонировали в векторе pGEM-T Vector Easy (Promega, США) согласно инструкциям производителей. Отбор клонов со вставками осуществляли с помощью белой голубой селекции, размер вставок определяли с помощью ПЦР со стандартными праймерами M13. Из отобранных клонов выделяли плазмидную ДНК

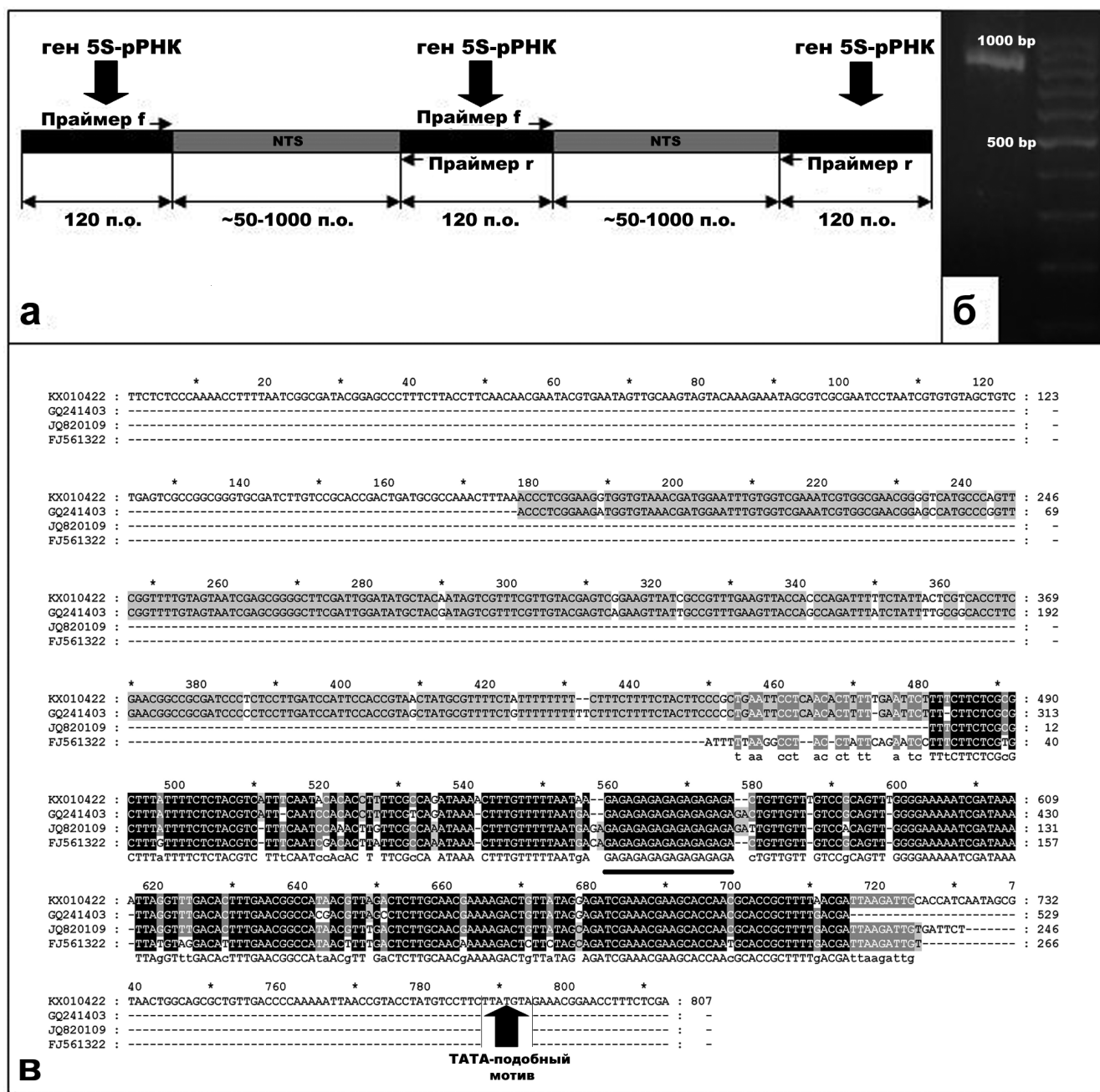


Рисунок. Организация локусов 5S-рДНК и система праймеров для амплификации NTS (а); электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами 5S1/5S2 на матрице тотальной ДНК *H. rhamnoides* L., маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder Jena Bioscience GmbH, Германия) (б); выравнивание последовательности NTS 5S-рДНК *H. rhamnoides* L. (KX010422) и гомологичных микросателлитных локусов *H. rhamnoides* L. (GQ241403), *Elaeagnus angustifolia* (JQ820109) и *Calligonum mongolicum* Turcz. (FG561322), жирной линией выделен мотив (GA)₉ (в)

с помощью GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Латвия) и секвенировали на секвенаторе ABI 3139xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Секвенирование проводили по 3 раза с каждого из M13-праймеров. Анализ последовательностей проводили с помощью программного обеспечения GenDoc [15] и BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты и обсуждение

Амплификация с праймерами 5S1/5S2 на матрице тотальной геномной ДНК *Hippophae rhamnoides* L. показала наличие единичного фрагмента

длиной около 900 п.о. (рисунок). После клонирования ПЦР-продукта вставки 10 отобранных клонов были секвенированы. Идентичность полученных последовательностей составляла 97–98%, что характерно для эволюционно зрелых видов, у которых давно произошла гомогенизация нетранскрибируемых спейсеров 5S-рДНК. Консенсусная 807-нуклеотидная последовательность NTS 5S-рДНК *Hippophae rhamnoides* L. была размещена в базе данных Genbank (KX010422).

Анализ полученной последовательности NTS 5S-рДНК *Hippophae rhamnoides* L. показал наличие восьминуклеотидного ТАТА-подобного мотива,

расположенного на расстоянии 26 п.о. до начала гена 5S-рРНК (рисунок). Наличие таких мотивов, схожих с классической последовательностью ТАТА-бокса, распространённого промотора архей и эукариот, является структурно-функциональной особенностью многих ранее описанных NTS 5S-рДНК.

Ещё одной особенностью NTS 5S-рДНК *Hippophae rhamnoides* L. является присутствие микросателлитного локуса (GA)₉ в позиции –252/–235 от начала гена 5S-рРНК. Среди растений подобное явление (но с другими микросателлитными мотивами) описано лишь у *Populus deltoides* (мотив (GAA)_{10–13}) и ещё у нескольких видов тополей, а также у *Lens culinaris* (мотив (TA)_{6–21}) [9, 16, 17]. Поэтому можно заключить, что NTS 5S-рДНК с микросателлитным мотивом (GA)₉ у растений найден впервые. Наличие микросателлитного мотива в последовательности NTS 5S-рДНК, однако, часто встречается у рыб: (GCT)₁₀ у *Potamotrygon motoro* [18], (CA)₁₃ у *Merluccius albus* [19], (GCT)_{8–11} у *Micropterus salmoides* [20], (CA)₄₈ у *Molva molva* [21], (CA)₁₄ у *Aulopus japonicus* [22], (TTTG)₅ у *Danio rerio* [23] и др. Широко известно, что NTS 5S-рДНК, как и многие другие спейсерные последовательности генома, являются эволюционно пластичными регионами. Эта пластичность обусловлена тем, что мутационные изменения в этих регионах не оказывают существенного влияния на функцию синтеза 5S-рРНК и, закрепляясь, достаточно быстро накапливаются. Появление микросателлитных повторов в NTS 5S-рДНК у облепихи, так же, как и у рассмотренных выше рыб и растений — это один из частных случаев данного процесса.

BLAST-анализ NTS 5S-рДНК *Hippophae rhamnoides* L. выявил высокий уровень гомологии достаточно протяженных участков изучаемой последовательности с ранее секвенированными микро-

сателлитными локусами *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae) [11], *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae) [24] и *Calligonum mongolicum* Turcz. (Polygonaceae) [25] (рисунок; таблица). Во всех этих последовательностях также присутствует тандемный мотив (GA)₉.

Таблица

Идентичность участков NTS 5S-рДНК *H. rhamnoides* L. и гомологичных микросателлитных локусов

Название локуса	Вид	Длина участка, гомологичного NTS 5S-рДНК <i>H. rhamnoides</i> L., п.о.	Идентичность, %
GQ241403	<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	529	93
JQ820109	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	238	92
FJ561322	<i>Calligonum mongolicum</i> Turcz.	239	89

Данная работа является первым шагом в изучении локусов 5S-рДНК у облепихи и её сородичей и может быть востребована при установлении молекулярно-филогенетических отношений между видами Elaeagnaceae, а также внести вклад в понимание организации генов 5S-рРНК у растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (Грант Президента № НШ-8315.2016.11) и с использованием уникальной научной установки “Комплекс для проведения междисциплинарных исследований в области сравнительной и функциональной геномики растений”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martins C. Wasko A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome // Focus on Genome Research / Eds. C.R. Williams. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2004. P. 289–319.

2. Wicke S., Costa A., Muñoz J., Quandt D. Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants // Mol. Phylogenet. Evol. 2011. Vol. 61. N 2. P. 321–332.

3. Vierna J., Wehner S., Höner zu Siederdissen C., Martínez-Lage A., Marz M. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans // Heredity. 2013. Vol. 111. N 5. P. 410–421.

4. Pendas A.M., Moran P., Martinez J.L., Garcia-Vasquez E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon × brown trout hybrid identification // Mol. Ecol. 1995. Vol. 4. N 2. P. 275–276.

5. Liu Z.L., Zhang D., Wang X.Q., Ma X.F. Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five asian pines // Am. J. Bot. 2003. Vol. 90. N 1. P. 17–24.

6. Mythili Avadhani M.N., Immanuel Selvaraj C., Tharashand C., Rajasekharan P.E. Molecular characterization of medicinal and aromatic plants by 5S rRNA NTS and PCR

RFLP — A mini review // Res. Biotechnol. 2012. Vol. 3. N 2. P. 41–48.

7. Brown G.R., Carlson J.E. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18s–5.8s–26s rRNA and 5s rRNA in two species of spruce (*Picea*) // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 95. N 1–2. P. 1–9.

8. Schmidt T., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. Physical mapping of rRNA genes by fluorescent in situ hybridization and structural analysis of 5S rRNA genes and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*) // Theor. Appl. Genet. 1994. Vol. 88. N 6. P. 629–636.

9. Wilson N. Genome analysis of *Populus* species: assessment of genetic diversity of *P. deltoides*, characterization of wide hybrids and phylogenetic analysis using molecular markers. New Delhi: Teri University, 2013. 177 p.

10. Александров О.С., Карлов Г.И., Сорокин А.Н., Потапенко Н.Х. Создание системы молекулярных маркеров для видовой идентификации представителей рода Тополь и анализа гибридов // Материалы III Всероссийской молодёжной конференции с участием иностранных учёных “Перспективы развития и проблемы современной ботаники” (Новосибирск, 10–14 ноября 2014 г.). Новосибирск: Академиздат, 2014. С. 123–124.

11. Islam A., Sinha P., Sharma S.S., Negi M.S., Tripathi S.B. Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite loci in *Hippophae rhamnoides* // Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B. Biol. Sci. 2015. DOI: 10.1007/s40011-015-0646-2.
12. Truta E., Capraru G., Rosu C.M., Zamfirache M.M., Olteanu Z., Manzu C. Morphometric pattern of somatic chromosomes in three Romanian seabuckthorn genotypes // Caryologia. 2011. Vol. 64. N 2. P. 189–196.
13. Zhou X., Ma J., Wang W., Gong N., Liu J. Genome size of the diploid hybrid species *Hippophae goniocarpa* and its parental species, *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* and *H. neurocarpa* ssp. *neurocarpa* (Elaeagnaceae) // Acta Biol. Cracoviensis Ser. Bot. 2010 Vol. 52. N 2. P. 12–16.
14. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12. N 1. P. 13–15.
15. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation [Электронный ресурс]. 1997. URL: <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm> (дата обращения: 10.08.2016).
16. Negi M.S., Rajagopal J., Chauhan N., Cronn R., Lakshmikumaran M. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides* // Genome. 2002. Vol. 45. N 6. P. 1181–1188.
17. Fernández M., Ruiz M.L., Linares C., Fominaya A., Pérez de la Vega M. 5S rDNA genome regions of *Lens* species // Genome. 2005. Vol. 48. N 5. P. 937–942.
18. Cruz V.P., Oliveira C., Foresti F. An intriguing model for 5S rDNA sequences dispersion in the genome of freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) // Mol. Biol. 2015. Vol. 49. N 3. P. 466–469.
19. Campo D., Machado-Schiaffino G., Horreo J.L., Garcia-Vazquez E. Molecular organization and evolution of 5S rDNA in the genus *Merluccius* and their phylogenetic implications // J. Mol. Evol. 2009. Vol. 68. N 3. P. 208–216.
20. Deiana A.M., Cau A., Salvadori S., Coluccia E., Cannas R., Milia A., Tagliavini J. Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome // Chromosome Res. 2000. Vol. 8. N 3. P. 213–218.
21. Moran P., Garcia-Vazquez E. Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology // Biochem. Mol. Biol. Educ. 2006. Vol. 34. N 2. P. 121–124.
22. Ota K., Tateno Y., Gojobori T. Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*: Teleostei, Aulopidae) // Gene. 2003. Vol. 317. N 1–2. P. 187–193.
23. Gornung E., De Innocentilis S., Annesi F., Sola L. Zebrafish 5S rRNA genes map to the long arms of chromosome 3 // Chromosome Res. 2000. Vol. 8. N 4. P. 362.
24. Gaskin J.F., Hufbauer R.A., Bogdanowicz S.M. Microsatellite markers for Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*; Elaeagnaceae) // Appl. Plant Sci. 2013. Vol. 1. N 9. P. 1300013.
25. Zhang Q., Zhu X.T. Microsatellite DNA loci from the drought desert plant *Calligonum mongolicum* Turcz. (Polygonaceae) // Con. Gen. 2009. Vol. 10. N 6. P. 1891–1893.

Поступила в редакцию 11.08.2016

Принята в печать 09.09.2016

MOLECULAR BIOLOGY

MOLECULAR GENETIC FEATURES OF 5S rDNA NON-TRANSCRIBED SPACER IN *HIPPOPHAE RHAMNOIDES* L.

O.S. Alexandrov*, A.V. Evtukhov, I.I. Kiselev, G.I. Karlov

Centre for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy; Timiryazevskaya ul. 49, Moscow, 127550, Russia

*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Amplification of sea buckthorn *Hippophae rhamnoides* L. 5S rDNA non-transcribed spacer with coding border anneal primers showed existence of single fragment. The fragment was cloned and sequenced. It was shown that length of the *Hippophae rhamnoides* L. 5S rDNA non-transcribed spacer is 807 bp. Analysis of the sequence allowed to detect a high homology with early described microsatellite locuses of *Hippophae rhamnoides* L., russian olive *Elaeagnus angustifolia* L. and *Calligonum mongolicum* Turcz., that include a (GA)₉ motif. These results may be useful to study a ribosomal RNA gene organization.

Keywords: 5S rDNA, non-transcribed spacer, microsatellite locus, *Hippophae rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Calligonum mongolicum* Turcz.

Сведения об авторах

Александров Олег Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: olegsandrov@gmail.com

Евтухов Алексей Владимирович — лаборант-исследователь Центра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: a_evtukhov@mail.ru

Киселёв Илья Игоревич — аспирант Центра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: der_dietrich@mail.ru

Карлов Геннадий Ильич — докт. наук, руководитель Центра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-72-01; e-mail: karlovg@gmail.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 615.277.3+577.2

ПОИСК МИШЕНЕЙ ДЛЯ ГОССИПОЛА В СОСТАВЕ БЕЛКА PARP1

С. Гросс, Е.Ю. Котова¹, Н.В. Малюченко^{2,*}, Дж.М. Паскаль³, В.М. Студитский^{1,2}

¹ Лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз;
США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333

² кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³ кафедра биохимии и молекулярной медицины, Университет Монреаля;
Канада, Квебек НЗС 3J7, г. Монреаль, 2900 бульвар Эдуарда Монпети

*e-mail: mal_nat@mail.ru

PARP1 представляет собой ключевой фермент, участвующий в репарации ДНК, репликации и транскрипции, а ингибиторы PARP1 рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты, действующие как химио- и радиосенсибилизаторы при традиционной терапии злокачественных образований. Ранее было обнаружено, что природный полифенол из хлопчатника — госсипол — способен ингибировать PARP1, но точный механизм его действия остается неизвестным. В данной работе проводили поиск мишеней действия госсипола, используя серию мутантов PARP1, лишенных домена BRCT или содержащих различные мутации в Zn3-домене. Ингибирование госсиполом PARP1 сравнивали с действием олапариба — ингибитора PARP1, с известным механизмом действия, направленным на каталитический центр PARP1. Было показано, что ни домен BRCT, ни какой-либо из трех Zn-доменов не требуются для ингибирования госсиполом каталитической активности PARP1, поскольку данный ингибитор проявлял сходную активность по отношению как к нативному, так и к мутантным вариантам PARP1. Полученные данные противоречат высказанному ранее предположению, согласно которому, мишенью для действия госсипола является BRCT-домен PARP1. Таким образом, мишенью действия госсипола, видимо, являются другие домены или междоменные участки белка PARP1.

Ключевые слова: PARP1, олапариб, госсипол, BRCT-домен, Zn3-домен, WGR-домен, поли(АДФ-рибозил)ирование.

Белки поли(АДФ-рибоза)-полимераз (PARP) являются ядерными и цитоплазматическими ферментами, которые расщепляют НАД⁺ до никотирамида и АДФ-рибозы с образованием длинных и разветвленных полимеров АДФ-рибозы на белках-мишенях, включая топоизомеразы, гистоны и PARP [1]. За исключением гистонов, поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1) является самым распространенным ядерным белком (1–2 миллиона молекул на клетку). Именно он ответственен за продукцию примерно 90% полимеров АДФ-рибозы в клетке [2, 3]. Поли(АДФ-рибозил)ирование является регулятором клеточного цикла, репликации, старения и гибели клетки, моделирования структуры хроматина, транскрипции генов и др. [4, 5]. Белок PARP1 мышей и человека (Рис. 1А; молекулярный вес — 116 кДа) имеет модульную структуру с тремя крупными функциональными областями: ДНК-связывающей, аутомодификации и каталитической [6, 7]. Область связывания с ДНК содержит три домена цинковых пальцев (Zn1, Zn2, Zn3), которые связываются с одноцепочечными или двухцепочечными разрывами в ДНК-цепи, а также с линкерной ДНК в хроматине [8]. Третий цинковый палец (Zn3), обнаруженный в области 250–350 а.о., является уникальным и отличается по структуре и функциям от Zn1 и Zn2 [9, 10]: он не только участвует

в активации PARP в ответ на повреждение ДНК, но также играет определенную роль в компактизации хроматина [11] [11]. Биохимические исследования демонстрируют, что Zn3 служит связующим звеном между ДНК-связывающей областью и WGR-доменом области аутомодификации, в результате такого взаимодействия происходит стимуляция каталитической активности PARP1 [12]. Область аутомодификации, расположенная в центральной части PARP1, содержит BRCT-домен (от breast cancer type 1 C Terminus) и WGR-домен, обогащенный остатками Trp (W), Gly (G) и Arg (R). BRCT обеспечивает белок-белковое взаимодействие и обычно содержится в белках, участвующих в репарации ДНК и контроле клеточного цикла [13]. Домен BRCT требуется для взаимодействия PARP1 с различными белками-партнерами, включая XRCC1 [14], hUbc9 [15], гистонами [16], oct-1 [17], и YY1 [18]. Аутомодификация (поли(АДФ-рибозил)ирование самого PARP1) может регулировать взаимодействие между PARP1 и его партнерами. BRCT-домен является потенциальной мишенью для действия различных низкомолекулярных ингибиторов, способных нарушать белок-белковые взаимодействия [19]. Мотив WGR вовлечен в формирование междоменных контактов. Каталитическая область PARP1 содержит два домена — спиральный (HD)

и АДФ-рибозил-трансферазный. Как правило, именно каталитическая область является мишенью действия ингибиторов PARP1. Ингибиторы PARP1 рассматриваются в качестве перспективных противоопухолевых агентов [20], действующих как химио- и радиосенсибилизаторы при традиционной терапии злокачественных образований. Кроме того, ингибиторы PARP1 могут использоваться как самостоятельные лекарственные средства против опухолей, в которых нарушены определенные пути репарации ДНК. Экспрессия PARP1 повышена при меланомах, раке легкого, молочной железы и других опухолевых заболеваниях. При этом повышенный уровень экспрессии считается прогностическим признаком, связанным с худшим прогнозом выживаемости.

Практически все существующие ингибиторы PARP1 ориентированы на связывание с каталитическим доменом PARP1 и конкуренцию с НАД⁺.

Следует отметить, что НАД⁺ является кофактором, который взаимодействует со многими ферментами, вовлеченными во множество клеточных процессов, поэтому конкуренция с НАД⁺ приводит к высокой токсичности. Эта основная причина, по которой многие ингибиторы PARP1 не прошли испытания и сошли с дистанции уже на I и II стадиях клинических исследований. Среди ингибиторов PARP1, дошедших до III стадии и одобренных как Европейской комиссией, так и Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США к применению в клинике, находится олапариб (выпускаемый под названием Lynparza™ “AstraZeneca”), однако применение олапариба из-за ряда побочных эффектов ограничено пациентами с диагнозом “рак яичников с мутацией BRCA”, чувствительными к препаратам платины. Поскольку использование ингибиторов, ориентированных на каталитический домен PARP1, демонстрирует высо-

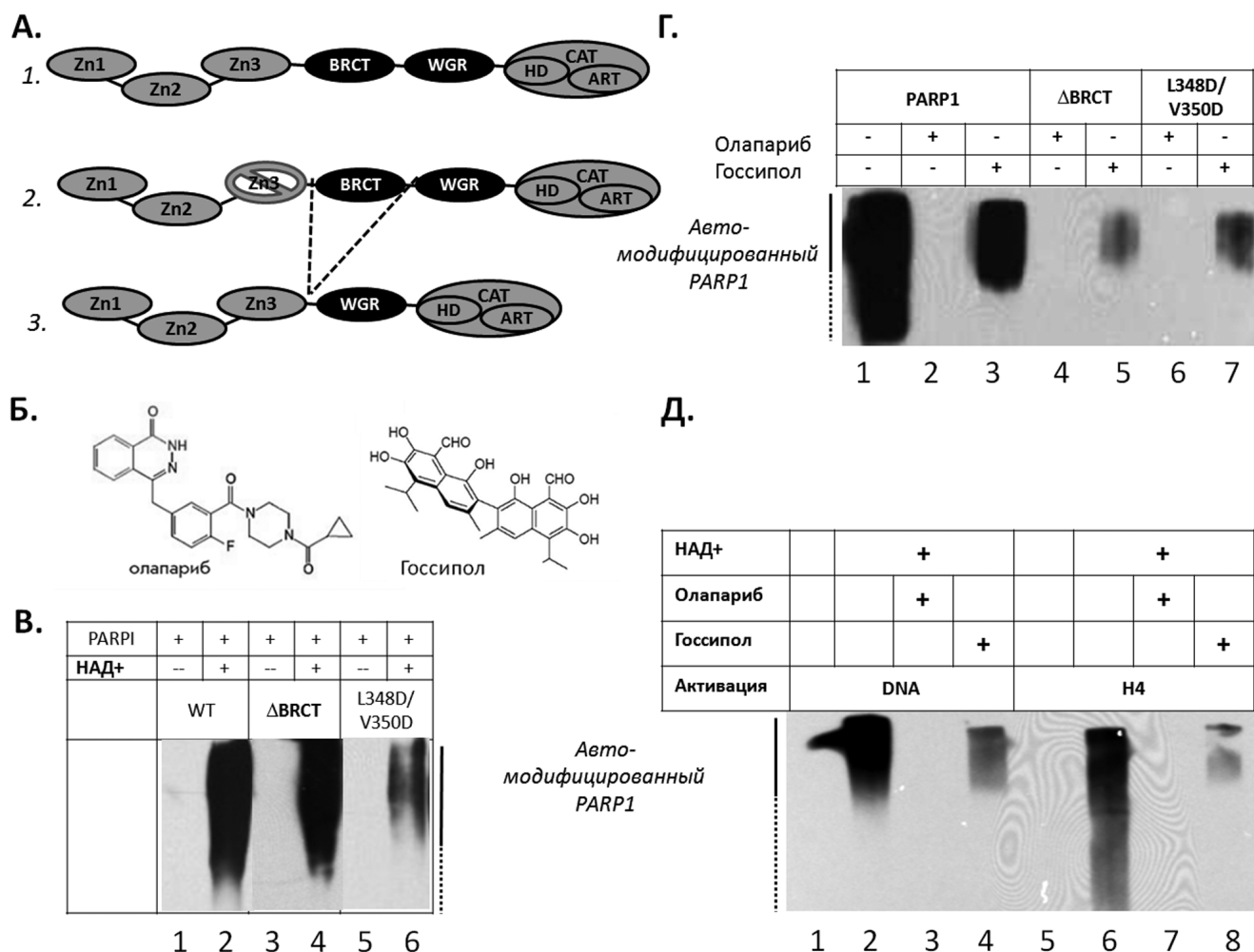


Рисунок. Анализ мишеней для госсипола в составе белка PARP1. **А.** Конструкты Полноразмерный PARP1 и его различные мутантные варианты. (1) PARP1, (2) PARP1, содержащий мутации в домене Zn3 (L348D/V350D), (3) PARP1 с делетированным доменом BRCT (ΔBRCT). **Б.** Структуры олапариба и госсипола. **В.** Вестерн-блот с моноклональными антителами к поли(АДФ)рибозе, показывающий эффективность авто-модификации PARP1 и его вариантов ΔBRCT и L348D/V350D (Zn3) в отсутствие ингибиторов олапариба и госсипола. **Г.** Вестерн-блот с моноклональными антителами к поли(АДФ)рибозе, показывающий эффективность авто-модификации PARP1, его варианта ΔBRCT и мутанта по Zn3 в присутствии ингибиторов олапариба и госсипола. **Д.** Вестерн-блот с моноклональными антителами к поли(АДФ)рибозе, показывающий эффективность авто-модификации PARP1 активированного с помощью ДНК или гистона H4 в отсутствие и в присутствии ингибиторов олапариба и госсипола.

Эффективность действия обоих ингибиторов не зависит от механизма активации PARP1

кую токсичность, перспективным подходом к созданию новых, менее токсичных ингибиторов PARP1, является поиск соединений, направленных на другие функциональные домены данного белка.

Госсипол может связываться с PARP1 и ингибировать его активность [19]. Госсипол является природным полифенолом из хлопчатника, обладающим мультифункциональными свойствами, в частности — противовирусной, противомикробной, противопрозоной, антиоксидантной, противоопухолевой активностью [21]. З. На и др. [19] предположили, что механизм ингибирующего PARP1 действия госсипола связан не с ингибированием активного центра фермента, а со взаимодействием с BRCT-доменами двух молекул PARP1, в результате которого происходит сшивка двух молекул фермента и фиксация конформации доменов PARP1, которая препятствует реализации каталитической активности. Однако авторы данной работы не исследовали роль BRCT-домена в контексте полноразмерного белка PARP1 и поэтому многие предположения выглядят достаточно спорными. В настоящей работе, с помощью мутантов PARP1, были проверены потенциальные мишени действия госсипола.

Материалы и методы

Полноразмерный PARP1 и его мутанты по доменам BRCT и Zn3 получали по методике, описанной ранее [22]. Схема используемых белков и мутантов представлена на рис. 1, А. Одноцепочечную ДНК (Sigma, США) обрабатывали ультразвуком в течение 1 ч для внесения разрывов. ДНК с разрывами использовали для активации PARP1. Для иммуноблоттинга использовали моноклональные антитела 10H (anti-PAR, Tulip Biolabs). Гистон H4 получали, как описано ранее [23]. В работе использовали госсипол (Santa Cruz Biotechnology, США, CAS 303-45-7) и олапариб (Santa Cruz Biotechnology, США, CAS 763113-22-0) (формулы представлены на рис. 1, Б). Активацию PARP1 проводили следующим образом: 1 пМ белка PARP1 смешивали с 100 нг ssДНК или 1 мкг гистона H4 в присутствии 1 мМ НАД⁺ (отдельно или в комбинации с 10 пМ ингибитора — олапариба или госсипола) в общем объеме 15 мкл. Реакционную смесь инкубировали 40 мин, реакцию останавливали добавлением 5 мкл 4-кратного буфера Лемли для нанесения образцов. Оценку поли(АДФ-рибозил)ирования PARP1 в присутствии ингибиторов проводили с помощью иммуноблоттинга. Вначале образцы в 4-кратном буфера Лемли разделяли в 4–12% NuPAGE геле в MOPS (3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота) буфере (Invitrogen, США) в течение 45 мин, а затем проводили перенос на поливинилиденфторидную мембрану при 4°C в течение 2 ч при 240 мА. Мембрану блокировали PBS-Tween, содержащим 5% сухого молока, в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывали и затем инкубировали с 10 мл 10H anti-PAR

антител (1:2000 разбавленных в PBS-Tween, содержащем 5% сухого молока) в течение 1 ч, отмывали три раза по 10 мин в PBS-Tween и инкубировали с 10 мл козжих антивидовых мышинных вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:5000 разбавленных в PBS-Tween, содержащем 5% сухого молока) в течение 1 ч, отмывали три раза по 10 мин в PBS-Tween. Продукты иммуноблоттинга выявляли с помощью ECL-реагента (Sigma, США).

Результаты

Анализ влияния олапариба и госсипола (рис. 1, В) на каталитическую активность PARP1 показал, что эти вещества в разной степени ингибируют реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования (PAR): олапариб — полностью блокирует, а госсипол — лишь частично (рис. 1, В, рис. 1, Г). Для того чтобы оценить роль домена BRCT в ингибировании PARP1 использовали мутант PARP1, содержащий делецию всего домена BRCT (Δ BRCT) (рис. 1, А, конструкция 3). Несмотря на то, что домен BRCT является частью области аутомодификации белка PARP1, его удаление не устраняет полностью способность к аутомодификации белка (рис. 1, В, дорожка 4). Олапариб полностью ингибировал аутомодификацию Δ BRCT белка, а госсипол — лишь частично (рис. 1, Г). Таким образом, оба вещества проявляют сходную активность по отношению как к нативному, так и к мутантному PARP1, что указывает, на то, что удаление BRCT-домена не влияет на активность ингибиторов. В случае с олапарибом, мишенью которого является каталитический центр фермента, такой результат был ожидаем, однако, для госсипола, мишенью которого может являться BRCT-домен, как описано в работе [19], результат оказался неожиданным.

Дальнейший поиск мишеней действия госсипола был проведен с использованием мутантов по Zn3-домену (рис. 1, А, конструкция 2), поскольку данная область также вовлечена в формирование междоменных взаимодействий внутри PARP1, а госсипол может нарушать такие взаимодействия. Для исследования использовали мутант по Zn3 с двумя мутациями Zn3 L348D/V350D в области PARP1, важной для компактизации хроматина [11]. Результаты показали, что мутантный белок также остается функционально активным (рис. 1, В) и его PAR-активность ингибируется в присутствии госсипола сходным образом (рис. 1, Г, дорожки 6, 7). Таким образом, BRCT- и Zn3-домены не являются мишенями действия госсипола.

В двух предыдущих сериях экспериментов активировали PARP1 путем смешивания с ДНК с одноцепочечным разрывом. Далее, сравнивали способность госсипола ингибировать активацию PARP1, вызванную ДНК, с H4-зависимой активацией (рис. 1, Д, дорожки 4,8) Видно, что госсипол ингибирует как ДНК-зависимую, так и H4-зависимую аутомодификацию PARP1, при этом эффект гос-

сипола в последнем случае — более выраженный. Поскольку в H4-зависимой автомодификации PARP1 не участвует ни один из цинковых пальцев PARP1, для действия госсипола эти домены не требуются.

Обсуждение результатов

На основаниях предыдущих исследований, была выказана гипотеза, что госсипол селективно связывается с BRCT-доменами двух молекул PARP1, вызывая димеризацию белка [19]. Такая белок-белковая сшивка госсиполом “фиксирует” PARP1 и не дает изменять конформацию внутри доменов; при этом PARP1 теряет свою каталитическую активность. Ряд исследований, указывает на то, что для активации PARP1, должно произойти конформационное изменение, в ходе которого происходит освобождение кармана активного центра от домена, “блокирующего” его [12, 24]. Это важное предположение о существовании ингибитора PARP1, действие которого не основано на ингибировании каталитической активности, могло бы положить основу для получения нового класса веществ. Чтобы проверить гипотезу об узнавании госсиполом BRCT-домена PARP1, мы использовали BRCT-мутанты. В наших экспериментах, разница между действием госсипола в отношении нативного и мутантного PARP1 не наблюдалась, что, указывает на то, что BRCT-домен не является мишенью действия госсипола. Расхождение полученных нами данных с предыдущими работами [19] вероятно, связано с тем, что в них был использован изолированный BRCT-домен, а в наших экспериментах рассматривали BRCT-домен в контексте всего белка PARP1. Поиск других мишеней действия госсипола в составе белка PARP1 был связан с использова-

нием мутантов по Zn3-домену и другим цинковым пальцам. Исследования продемонстрировали, что ни один из цинковых пальцев также не является мишенью действия госсипола.

В дальнейшем, эксперименты могут быть направлены на поиск мишеней госсипола в других доменах PARP1. В рамках данной работы исследовали действие госсипола на мутантах только по четырем доменам PARP1: трём цинковым пальцам и BRCT, при этом неизученными остались другие области PARP1, например, домен WGR. Не исключено, что госсипол действует не на конкретный домен, а на интерфейс из нескольких доменов. По отдельности домены PARP1 не функционируют полноценно, и часто работают вместе, чтобы осуществить определенную функцию. Например, Zn3- и WGR-домены действуют кооперативно, в результате чего сначала происходит связывание с ДНК, а затем конформационная перестройка белка PARP1 и стимуляция каталитического домена [12]. Экспериментальный подход, предложенный в данной работе, позволяет исследовать различные вещества, ингибирующая активность которых направлена за пределы каталитического домена PARP1. Настоящее исследование способствует лучшему пониманию сложного механизма активации PARP и дальнейшему поиску терапевтических веществ — ингибиторов PARP1 с новыми активностями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (соглашение Минобрнауки России № 14.604.21.0063, RFMEFI60414X0063) (эксперименты с ингибиторами PARP1 и грантом NIH GM58650 (обработка методик).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily // *BioEssays*. 2004. Vol. 26. N 8. P. 882–893
2. Ludwig A., Behnke B., Holtlund J., Hilz H. Immunquantitation and size determination of intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase from acid precipitates. An analysis of the in vivo status in mammalian species and in lower eukaryotes // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. N 15. P.6993–6999.
3. Yamanaka H., Penning C.A., Willis E.H., Wasson D.B., Carson D.A. Characterization of human poly(ADP-ribose) polymerase with autoantibodies // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. N 8. P. 3879–3883.
4. Haince J.F., McDonald D., Rodrigue A., Dery U., Masson J.Y., Hendzel M.J., Poirier G.G. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 2. P. 1197–1208.
5. Thomas C., Tulin A.V. Poly-ADP-ribose polymerase: machinery for nuclear processes // *Mol. Aspects Med.* 2013. Vol. 34. N 6. P. 1124–1137.
6. Nishikimi M., Ogasawara K., Kameshita I., Taniguchi T., Shizuta Y. Poly(ADP-ribose) synthetase. The DNA binding domain and the automodification domain // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. N 11. P. 6102–6105.
7. Kameshita I., Matsuda Z., Taniguchi T., Shizuta Y. Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of

- three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. N 8. P. 4770–4776.
8. Gibson B.A., Kraus W.L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. Vol. 13 N 7. P. 411–424.
9. Langelier M.F., Servent K.M., Rogers E.E., Pascal J.M. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 7. P. 4105–4114.
10. Tao Z., Gao P., Hoffman D.W., Liu H.W. Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif // *Biochemistry*. 2008. Vol. 47. N 21. P. 5804–5813.
11. Langelier M., Ruhl D. D., Planck J.L., Kraus W.L., Pascal J.M. The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. N 24. P. 18877–18887.
12. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1 // *Science* 2012. Vol. 336. N 6082. P. 728–732.

13. Bork P., Hofman K., Buche P., Neuwal A.F., Altschu S.F., Koonin E.V. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins // *Faseb J.* 1997. Vol. 11. N 1. P. 68–76.
14. Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage // *Mol. Cell. Biol.* 1998. Vol. 18. N 6. P. 3563–3571.
15. Masson M., Menissier-de Murcia J., Mattei, M.G., de Murcia G., Niedergang C.P. Poly(ADP-ribose) polymerase interacts with a novel human ubiquitin conjugating enzyme: hUbc9 // *Gene.* 1997. Vol. 190. N 2. P. 287–296.
16. Buki K.G., Bauer P.I., Hakam A., Kun E. Identification of domains of poly(ADP-ribose) polymerase for protein binding and selfassociation // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. N 7. P. 3370–3377.
17. Nie J., Sakamoto S., Song D., Qu Z., Ota K., Taniguchi T. Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 424. N 1–2. P. 27–32.
18. Griesenbeck J., Ziegler M., Tomilin N., Schweiger M., Oei S.L. Stimulation of the catalytic activity of poly(ADP-ribose) transferase by transcription factor Yin Yang 1 // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 443. N 1. P. 20–24.
19. Na Z., Peng B., Ng S., Pan S., Lee J.S., Shen H.M., Yao S.Q. A small-molecule protein-protein interaction inhibitor of PARP1 that targets its BRCT domain // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. Vol. 54. N 8. P. 2515–2519.
20. Malyuchenko N.V., Kotova E.Yu., Kulaeva O.I., Kirpichnikov M.P., Studitskiy V.M. PARP1 inhibitors: Antitumor drug design // *Acta Naturae.* 2015. Vol. 7. N 3. P. 27–37.
21. Gilbert N.E., O'Reilly J.E., Chang C.J., Lin Y.C., Brueggemeier R.W. Antiproliferative activity of gossypol and gossypolone on human breast cancer cells // *Life Sci.* 1995. Vol. 57. N 1. P. 61–67.
22. Langelier M.F., Planck J.L., Servent K.M., Pascal J.M. Purification of human PARP1 and PARP1 domains from *E.coli* for structural and biochemical analysis // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 780. P. 209–226.
23. Kotova E., Pinnola A.D., Tulin A.V. Small-molecule collection and high-throughput colorimetric assay to identify PARP-1 inhibitors // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 780. P. 491–516.
24. Dawicki-McKenna J.M., Langelier M.F., DeNizio J.E., Riccio A.A., Cao C.D., Karch K.R., McCauley M., Steffen J.D., Black B.E., Pascal J.M. PARP-1 activation requires local unfolding of an autoinhibitory domain // *Mol. Cell.* 2015. Vol. 60. N 5. P. 755–768.

Поступила в редакцию 04.07.2016

Принята в печать 02.09.2016

MOLECULAR BIOLOGY

EVALUATING PARP1 DOMAINS AS GOSSYPOL TARGETS

S. Gross¹, E. Yu. Kotova¹, N.V. Maluchenko^{2,*}, J.M. Pascal³, V.M. Studitskiy^{1,2}

¹Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;

²Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

³Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, 2900 Boulevard Edouard-Montpetit, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

*e-mail: mal_nat@mail.ru

Poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) is an important enzyme, which is involved in DNA repair, replication, and transcription. Prospective anti-cancer drug gossypol inhibits human PARP1, but the mechanism of inhibition remains unknown. Previously it has been shown that gossypol interacts with purified BRCA1 C-terminus (BRCT) domain *in vitro*, but it remains unclear whether it inhibits PARP1 through BRCT domain in the context of the full length protein. Here it is shown that the BRCT domain within the full-length PARP1 protein is not required for inhibition of catalytic activity of PARP1 by gossypol. Our data obtained using a series of PARP1 mutations and H4-dependent pathway of PARP1 activation also show that Zinc fingers, the DNA binding domains of PARP1, are not involved in the inhibition of PARP1 catalytic activity by gossypol. Thus the likely candidate target(s) for gossypol action are other domains of PARP1 or interdomain linkers.

Keywords: PARP1, olaparib, gossypol, BRCT domain, Zn3 domain, WGR-domain, poly ADP-ribosylation.

Сведения об авторах

Гросс Скотт (Gross Scott) — студент лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз. E-mail: tug29564@temple.edu

Котова Елена Юрьевна — науч. сотр. лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз. E-mail: elena.kotova@fccc.edu

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05; e-mail: mal_nat@mail.ru

Паскаль Джон Мэттесон (Pascal John Matteson) — канд. биол. наук, проф. кафедры биохимии университета Монреаля. E-mail: john.pascal@umontreal.ca

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitskiy@fccc.edu

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 57.02; 615.9

КАРНОЗИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КАДМИЯО.И. Куликова^{1,2,*}, Т.Н. Федорова¹, С.Л. Стволинский¹, В.С. Орлова², А.Н. Иноземцев³¹ Лаборатория клинической и экспериментальной нейрохимии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научный центр неврологии"; Россия, 125367, г. Москва, Волоколамское ш., д. 80;² Кафедра системной экологии, экологический факультет, Российский университет дружбы народов; Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;³ Кафедра высшей нервной деятельности, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: posibilidad@mail.ru

В работе исследовано защитное действие природного дипептида карнозина на антиоксидантную систему крыс в условиях окислительного стресса, вызванного хроническим введением кадмия. Окислительный статус экспериментальных животных оценивали по ряду информативных параметров железо-индуцированной хемилюминесценции. Показано, что введение кадмия в течение 7 сут приводит к снижению длительности латентного периода хемилюминесценции в ткани мозга, печени и плазме крови, свидетельствующему об истощении системы эндогенной антиоксидантной защиты. Введение крысам карнозина одновременно с кадмием приводило к значительному повышению уровня антиоксидантной защиты в плазме крови, печени и мозге животных. Вместе с тем карнозин предотвращал нарастание содержания липидных гидроперекисей в мозге и препятствовал развитию перекисного окисления липидов в печени и плазме крови животных. Механизм протекторного действия карнозина в условиях индукции системного окислительного стресса кадмием исследовали на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Внесение в инкубационную среду кадмия в итоговой концентрации 5 мкМ снижало жизнеспособность клеток культуры, определяемую с помощью МТТ-теста; внесение одновременно с кадмием карнозина (итоговая концентрация 0,25 мМ) при 24-часовой инкубации приводило к повышению жизнеспособности клеток. При этом в конечной концентрации 1 мМ карнозин эффективно препятствовал развитию некротических повреждений клеток нейробластомы, подавляя образование активных форм кислорода, измеренных методом проточной цитометрии. Полученные результаты указывают на способность карнозина препятствовать развитию окислительного стресса в условиях токсического действия кадмия.

Ключевые слова: карнозин, кадмий, окислительный стресс, крысы Wistar, железо-индуцированная хемилюминесценция, нейробластома человека SH-SY5Y, АФК, жизнеспособность, клеточная смерть.

Кадмий является одним из наиболее токсичных и канцерогенных тяжелых металлов. Он рассматривается как серьезный экологический и промышленный загрязнитель и может представлять значительную опасность для здоровья людей и животных даже в низких дозах, так как накапливается в тканях организма и имеет долгий период полувыведения [1]. Кадмий присутствует в воздухе промышленных предприятий, в различных выбросах от производства, в пищевых продуктах и сигаретном дыме [2]. Воздействие кадмия может вызывать поражение многих органов и тканей, включая ЦНС, что приводит к различным патологиям [3, 4]. Кадмий является этиологическим фактором нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона [5]. Он вызывает неврологические изменения в организме человека и животных, что приводит к снижению внимания, обонятельной дисфункции и дефициту памяти [6], вызывает раз-

дражительность и снижает способность к обучению [7]. Хроническое воздействие кадмия на крыс приводит к изменению количества форменных элементов крови, а также усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови [8]. Потенциальный механизм токсичности кадмия заключается в способности индуцировать генерацию активных форм кислорода (АФК), что приводит к истощению резервов антиоксидантной системы [9, 10, 11], развитию окислительного стресса (ОС), митохондриальной дисфункции и апоптозу [12, 13]. Особенно значимыми эти процессы являются для нервной системы, что связано с избирательной чувствительностью клеток возбудимых тканей к окислительной деструкции [14, 15].

Многие низкомолекулярные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, альфа-токоферол, глутатион, гистидин-содержащие дипептиды и другие), способны не только перехватывать активные ра-

дикалы, но и хелатировать ионы металлов, снижая при этом их каталитическую активность в процессах продукции АФК и активных форм азота [11].

Карнозин (β -аланил-L-гистидин) является эффективным протектором клеток и тканей от ОС, сочетающим как прямое антиоксидантное действие, так и косвенное, выраженное в модулировании активности вовлеченных в развитие ОС ферментов и NMDA-рецепторов [16]. Он нормализует физиологические параметры, нарушенные острой гипобарической гипоксией [17]. Карнозин и его аналоги могут образовывать комплексы с двухвалентными металлами: медью, кобальтом, магнием, цинком, кадмием [18]. Среди природных антиоксидантов карнозин отличается способностью проникать через гематоэнцефалический барьер в ткань мозга [19].

В то же время в литературе отсутствуют данные, касающиеся системного протекторного действия карнозина в условиях интоксикации кадмием экспериментальных животных, а также недостаточно изучены механизмы защитного действия карнозина в условиях токсического воздействия кадмия на клеточные культуры. В связи с вышесказанным изучение способности карнозина в условиях токсического действия кадмия препятствовать развитию ОС в тканях, наиболее подверженных окислительным повреждениям, представляется актуальной задачей.

Целью данной работы явилось изучение протекторного действия природного антиоксиданта карнозина на эндогенный антиоксидантный статус и состояние процессов ПОЛ в плазме крови, печени и мозге крыс Wistar в условиях токсического действия кадмия с оценкой механизмов защиты в опытах *in vitro* на клеточной культуре нейробластомы человека SH-SY5Y.

Материалы и методы

Эксперименты *in vivo*. Экспериментальные исследования были проведены на 27 крысах самцов Wistar в возрасте 8 мес с массой тела 280–300 г, которые содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом суточном цикле “день/ночь” и свободном доступе к воде и пище.

Крысам внутривентриально в течение 7 сут вводили хлорид кадмия (1 мкМ, из расчёта 1 мл/кг массы тела) и карнозин (100 мг/мл, из расчета 1 мл/кг массы) (Namari Chemicals Ltd., Япония), приготовленные на физиологическом растворе.

Протокол эксперимента

Крыс разделили на 4 группы:

1 — контрольные животные: две инъекции физиологического раствора с интервалом 3 ч;

2 — карнозин: первая инъекция — физиологический раствор, вторая через 3 ч — карнозин;

3 — кадмий: первая инъекция — кадмий, вторая через 3 ч — физиологический раствор;

4 — кадмий + карнозин: первая инъекция — кадмий, вторая через 3 ч — карнозин.

На седьмые сутки животных декапитировали и отбирали пробы плазмы крови, печени и большие полушария головного мозга. В кровь добавляли 1%-ный раствор гепарина, чтобы предотвратить её свертывание, затем кровь центрифугировали 10 мин при 3000 г и отбирали плазму. Все полученные образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до дальнейшего использования.

Метод железо-индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) биологических образцов. Состояние процессов ПОЛ и уровень эндогенной антиоксидантной защиты исследовали с помощью метода, предложенного Ю.А. Владимировым и адаптированного применительно к прибору “Luminometer-1251” (ЛКВ, Швеция) [20]. Анализировали следующие параметры: быструю вспышку ХЛ (h), интенсивность которой характеризует уровень предобразованных продуктов ПОЛ; латентный период (τ), свидетельствующий о резистентности субстрата к дальнейшему окислению, отражающую эндогенный антиоксидантный потенциал; максимально возможную интенсивность ХЛ (H), связанную с дальнейшим окислением ионов двухвалентного железа и накоплением продуктов ПОЛ.

Подготовка образцов к анализу. Плазму крови размораживали в термостате при 37°C . К 0,05 мл плазмы добавляли 0,85 мл фосфатного буфера. Навеску ткани (большие полушария головного мозга, печень) гомогенизировали в присутствии фосфатного буфера (60 мМ KH_2PO_4 и 105 мМ KCl при pH 7,45); к 0,1 мл 10%-ного тканевого гомогената добавляли 0,8 мл фосфатного буфера.

Регистрация показателей. Кювету с полученной суспензией помещали в измерительную камеру прибора (разогретую до 37°C с постоянным перемешиванием) и регистрировали показания фоновых величин. Для инициирования хемилюминесценции с помощью диспенсера в кювету вносили 0,1 мл раствора двухвалентного железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в конечной концентрации 2,5 мМ и регистрировали кривую люминесценции.

Эксперименты *in vitro*. Экспериментальные исследования были проведены на клеточной культуре нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC, США).

Клетки культивировали на смеси сред Игла MEM (minimal essential medium) с солями Эрла с глутамином (ПанЭко, Россия) и F-12 без глутамин (ПанЭко, Россия) в пропорции 1:1, с добавлением 1%-ного раствора пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА Laboratories, США). Культуру содержали в клеточном инкубаторе (ShelLab) при 37°C , 90% влажности, 5% CO_2 . Каждые 3 сут производили замену среды. Клетки каждые 7–8 сут пересевали в зависимости от интенсивности роста.

Для определения дозо-зависимого эффекта токсичности кадмия спустя 3 сут после пассажа к клеткам добавлялся хлорид кадмия в концентрациях 10 нМ–10 мМ. Для определения протекторного действия карнозина к кадмию в выбранной

концентрации добавлялся карнозин в концентрациях 0,25–5 мМ (МТТ-тест) и 1 мМ (проточная цитометрия). Во всех случаях клетки инкубировали 24 ч.

МТТ-тест. Количество жизнеспособных клеток определяли в 96-луночных планшетах с помощью реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид) на спектрофотометре для микропланшетов Synergy H4 при длинах волн 570 и 660 нм [21]. Уровень сигнала в контрольных лунках принимали за 100%.

Определение доли мертвых клеток и уровня АФК. Долю мертвых клеток и уровень АФК в клеточной популяции определяли на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences, США) с использованием иодида пропидия — PI (Invitrogen) и 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата — DCFH2-DA (Invitrogen) соответственно. Иодид пропидия и DCFH2-DA добавляли в конечных концентрациях 10 мкМ за 3 мин и за 30 мин до измерения соответственно.

Оценивали полученные из гистограмм данные, по оси ординат откладывали количество событий, по оси абсцисс — распределение флуоресценции иодида пропидия и DCFH2-DA. Данные обрабатывали в программе CellQuestPro (BD, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрического критерия *U* Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Влияние кадмия на процессы ПОЛ и антиоксидантный статус в плазме крови, печени и ткани мозга животных. В мозге крыс, получавших кадмий, отмечалось повышение уровня липидных гидроперекисей (h, мВ) на 9%, в плазме крови и печени уровень липидных гидроперекисей колебался в пределах контрольных величин. Значительное повыше-

ние максимальной интенсивности ПОЛ (Н, мВ) отмечалось в плазме крови (на 41%) и печени крыс (на 15%); в мозге достоверного изменения отмечено не было. При этом длительность латентного периода ХЛ (τ) в плазме крови снижалась на 40%, в печени — на 49%, а в мозге — на 41% (рис. 1).

Оценка протекторного действия карнозина на процессы ПОЛ и антиоксидантный статус в плазме крови, печени и ткани мозга в условиях длительного введения кадмия. Введение карнозина интактным животным не оказывало существенного влияния на изучаемые параметры в плазме крови. При этом в печени карнозин повышал длительность латентного периода ХЛ на 11%, а в мозге снижал уровень липидных гидроперекисей на 10% относительно контроля.

Ежедневное введение карнозина через 3 ч после кадмия в течение 7 сут способствовало снижению уровня липидных гидроперекисей в мозге до контрольных значений. Максимальная интенсивность ПОЛ в печени снижалась до контрольных значений, в то время как в плазме крови этот показатель снижался на 13% относительно животных, получавших кадмий, но оставался повышенным относительно интактных животных. При этом длительность латентного периода ХЛ в плазме крови повышалась до контрольных величин, в мозге и печени — до 92–93%.

Оценка защитного действия карнозина на жизнеспособность клеток. В предварительных экспериментах по оценке дозозависимого влияния кадмия на жизнеспособность клеток была подобрана его концентрация равная 5 мкМ, которая в условиях 24-часовой инкубации достоверно снижала оцениваемое по МТТ-тесту количество выживших клеток на 25% [23]. Добавление карнозина в инкубационную среду, содержащую кадмий, приводило к увеличению количества жизнеспособных клеток. Наиболее выраженное защитное действие карнозина проявлялось при его концентрации, равной 0,25 мМ.

Оценка защитного действия карнозина на гибель клеток и уровень АФК. Было установлено, что в присутствии 10 мкМ кадмия доля мертвых клеток, увеличивается в среднем на 64% (рис. 2, А), а уровень АФК на 40% (рис. 2, Б). При этом внесение в культуральную среду 1 мМ карнозина эффективно препятствовало развитию некротических повреждений клеток и снижало их смертность на 51%. Также карнозин в этих условиях обеспечивал подавление продукции АФК. Основанием для выбора эффективной протекторной дозы карнозина послужили данные проведенных ранее исследований [24, 25], в которых по результатам ХЛ было показано, что карнозин в конечной концентрации 1 мМ снижает на 50% содержание преобразованных липидных гидроперекисей.

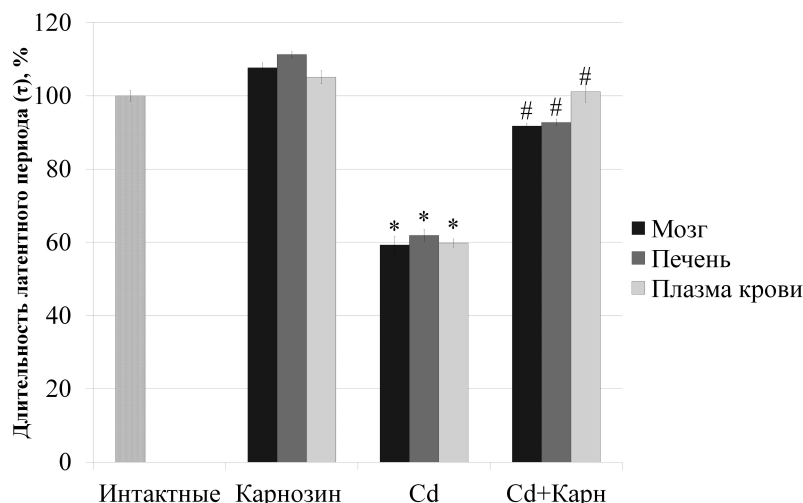


Рис. 1. Влияние кадмия и карнозина при хроническом введении крысам на длительность латентного периода хемилюминесценции в плазме крови и в тканях мозга и печени. Значения у контрольной группы животных приняты за 100%.

* — $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе; # — $p < 0,05$ по отношению к группе животных, получавших кадмий

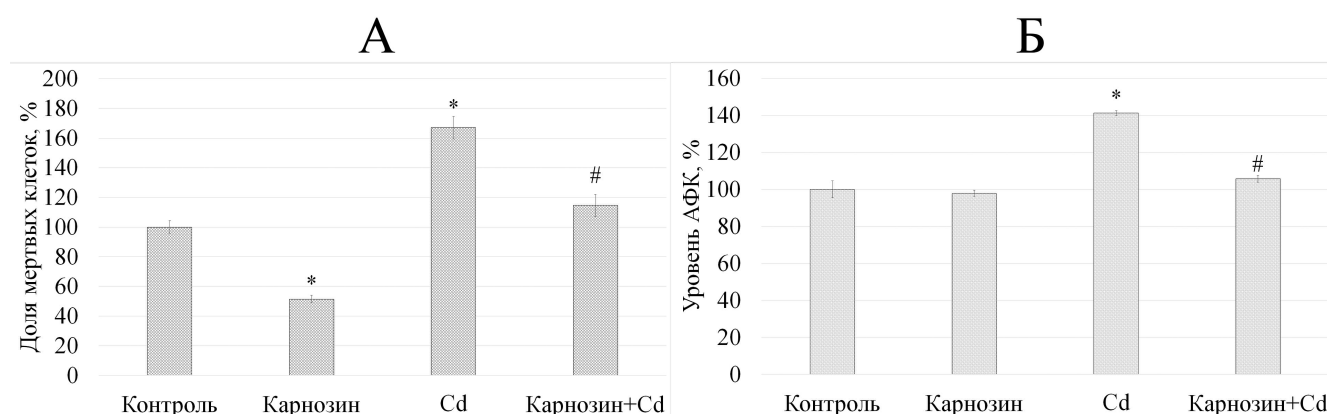


Рис. 2. Влияние 1 мМ карнозина на долю мертвых клеток (А) и уровень АФК (Б), в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях интоксикации 10 мкМ хлорида кадмия. Значения, полученные для интактных клеток, приняты за 100%. * — $p < 0,05$ по отношению к интактным клеткам, # — по отношению к клеткам, к которым добавлен кадмий

Полученные данные свидетельствуют о том, что в организме животных на фоне системного введения кадмия происходит значительное снижение активности эндогенной антиоксидантной системы защиты и развитие окислительных процессов, которые проявились в повышении максимальной интенсивности ПОЛ в плазме и печени животных и в повышении уровня липидных гидроперекисей в мозге животных. Избирательное увеличение уровня липидных гидроперекисей в мозге указывает на его более высокую чувствительность к окислительным повреждениям, обусловленную токсичностью кадмия. Введение карнозина в этих условиях способствовало значительному повышению уровня антиоксидантной защиты в плазме крови, печени и мозге животных на фоне предотвращения роста липидных гидроперекисей в мозге и развития процессов ПОЛ в печени и плазме крови.

Важным аспектом действия карнозина является не только способность предотвращать развитие ОС в патологических условиях, но и регулировать окислительный баланс в организме здоровых животных. Так, введение карнозина интактным животным способствовало повышению уровня эндо-

генной антиоксидантной защиты на 8%, 11% и 5% в мозге, печени и плазме крови соответственно.

На культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y было обнаружено, что при токсическом воздействии кадмия карнозин в концентрации 0,25 мМ в культуральной среде значительно увеличивает жизнеспособность клеток, определяемую с помощью МТТ-теста, а в концентрации, равной 1 мМ, как было установлено с помощью метода проточной цитометрии, снижает их смертность и предотвращает образование АФК. Полученные данные свидетельствуют о прямом антиоксидантном действии карнозина в условиях токсичности кадмия.

В целом полученные результаты указывают на способность карнозина препятствовать развитию окислительного стресса в условиях токсического действия кадмия как на уровне целого организма, так и отдельных органов. При этом протекторное действие карнозина обусловлено его способностью препятствовать образованию АФК и предотвращать гибель клеток, обусловленную некротическими процессами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01416а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brzoska M.M., Majewska K., Kupraszewicz E. Effects of low, moderate and relatively high chronic exposure to cadmium on long bones susceptibility to fractures in male rats // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2010. Vol. 29. N 3. P. 235–245.
2. Hammond P.B., Foulkes E.C. Metal ion toxicity in man and animals // *Metal ions in biological systems* / Ed. H. Sigel. N.Y.: Marcel Dekker, 1986. P. 157–200.
3. Satoh M., Koyama H., Kaji T., Kito H., Tohyama C. Perspectives on cadmium toxicity research // *Tohoku J. Exp. Med.* 2002. Vol. 196. N 1. P. 23–32.
4. Thompson J., Bannigan J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo // *Reprod. Toxicol.* 2008. Vol. 25. N 3. P. 304–315.
5. Jiang L.F., Yao T.M., Zhu Z.L., Wang C., Ji L.N. Impacts of Cd(II) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. N 1774. P. 1414–1421.
6. Lukawski K., Nieradko B., Sieklucka-Dziuba M. Effects of cadmium on memory processes in mice exposed to transient cerebral oligemia // *Neurotoxicol. Teratol.* 2005. N 27. P. 575–584.
7. Иноземцев А.Н., Бокиева С.Б., Карпущина О.В., Гумаркалиева К.З. Влияние сочетанного воздействия тяжелых металлов и пирасетама на обучение и память крыс // *Докл. РАН.* 2008. Т. 422. № 5. С. 700–703.
8. Фролова Н.А. Биологическое действие кадмия при хроническом воздействии в антенатальный и постнатальный периоды развития крыс // *Токсикол. Вестник.* 2007. № 1. С. 11–14.

9. *Wajten W., Beyersmann D.* Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress // *Bio-metals*. 2004. Vol. 17. N 1. P. 65–78.
10. *Abu-Taweel G.M., Ajarem J.S., Ahmad M.* Protective Effect of curcumin on anxiety, learning behavior, neuromuscular activities, brain neurotransmitters and oxidative stress enzymes in cadmium intoxicated mice // *J. Behav. Brain Science*. 2013. N 3. P. 74–84.
11. *Jomova K., Valko M.* Advances in metal-induced oxidative stress and human disease // *Toxicology*. 2011. Vol. 283. N 2–3. P. 65–87.
12. *Nishimura Y., Yamaguchi J.Y., Kanada A., Horimoto K., Kanemaru K., Satoh M., Oyama Y.* Increase in intracellular Cd²⁺ concentration of rat cerebellar granule neurons incubated with cadmium chloride: cadmium cytotoxicity under external Ca²⁺-free condition // *Toxicol. In Vitro*. 2006. Vol. 20. N 2. P. 211–216.
13. *Jimi S., Uchiyama M., Takaki A., Suzumiya J., Hara S.* Mechanisms of cell death Induced by cadmium and arsenic // *Ann. N.Y. Acad. of Sci.* 2004. Vol. 1011. N 1. P. 325–331.
14. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Free radical in biology and medicine, 3rd ed. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1999. 617–783 p.
15. *Федорова Т.Н., Максимова М.Ю., Варакин Ю.Я., Логвиненко А.А., Гнедовская Е.В., Суслина З.А.* Окисляемость липопротеинов крови у пациентов с нарушениями мозгового кровообращения // *Анналы клин. и эксперим. неврологии*. 2014. Т. 8. № 1. С. 30–33.
16. *Болдырев А.А.* Карнозин и защита тканей от окислительного стресса. М.: Диалог-МГУ, 1999. 364 с.
17. *Berezhnoy D.S., Bokieva S.B., Stvolinskii S.L., Fedorova T.N., Inozemtsev A.N.* Effect of carnosine on conditioned passive avoidance response in the norm and under hypoxia conditions // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 3. P. 105–109.
18. *Boldyrev A.A.* Carnosine: new concept for the function of an old molecule // *Biochemistry (Mosc)*. 2012. Vol. 77. N 4. P. 313–326.
19. *Абаимов Д.А., Сариев А.К., Танкевич М.В., Пантюхова Е.Ю., Прохоров Д.И., Федорова Т.Н., Лопачев А.В., Стволинский С.Л., Коновалова Е.В., Сейфулла Р.Д.* Исследование базовых фармакокинетических характеристик и эффективности проникновения в ткань мозга дипептида карнозина в эксперименте // *Эксп. клин. фармакол.* 2015. Т. 78. № 3. С. 30–35.
20. *Федорова Т.Н., Реброва О.Ю., Ларский Э.Г.* Модификация метода определения активности процессов свободнорадикального окисления // *Лабораторное дело*. 1991. № 3. С. 37–39.
21. *Akkuratov E.E., Lopacheva O.M., Kruusmägi M., Lopachev A.V., Shah Z.A., Boldyrev A.A., Liu L.* Functional interaction between Na/K-ATPase and NMDA receptor in cerebellar neurons // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2015. Vol. 52. N 3. P. 1726–1734.
22. *Boldyrev A., Song R., Djatlov V., Lawrence D., Carpenter D.* Neuronal cell death and reactive oxygen species // *Cell Mol. Neurobiol.* 2000. Vol. 20. N 4. P. 433–450.
23. *Федорова Т.Н., Куликова О.И., Стволинский С.Л., Орлова В.С.* Протекторное действие (S)-трелокс-карнозина на культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях токсичности тяжелых металлов // *Нейрохимия*. 2016. Т. 33. № 1. С. 63–69.
24. *Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Куликова О.И., Коновалова Е.В., Левачева И.С., Самсонова О., Баковский У.* Эффективность нейропротекторного действия новых производных природного антиоксиданта карнозина в условиях окислительного стресса *in vitro* и *in vivo* // *Анналы клин. и эксперим. неврологии*. 2016. Т. 10. № 1. С. 47–52.
25. *Stvolinsky S.L., Bulygina E.R., Fedorova T.N., Meguro K., Sato T., Tyulina O.V., Abe H., Boldyrev A.A.* Biological activity of novel synthetic derivatives of carnosine // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2010. Vol. 30. N 3. 395–404.

Поступила в редакцию 13.07.2016
Принята в печать 29.08.2016

PHYSIOLOGY

CARNOSINE PREVENTS THE DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS IN THE CONDITIONS OF TOXIC ACTION OF CADMIUM

O.I. Kulikova^{1,2,*}, T.N. Fedorova¹, S.L. Stvolinsky¹, V.S. Orlova², A.N. Inozemtsev³

¹ *Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Research Center of Neurology, Volokolamskoe shosse 80, Moscow, 125367, Russia;*

² *Department of System Ecology, Ecological Faculty, Peoples' Friendship University of Russia, Miklukho-Maklaya ul. 6, Moscow, 117198, Russia;*

³ *Department of Higher Nervous Activity, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234, Russia*

*e-mail: posibilidad@mail.ru

Protective effect of the natural dipeptide carnosine on the antioxidant system of rats in conditions of oxidative stress caused by the chronic cadmium administration was investigated. Oxidative status of experimental animals were evaluated on a number of informative parameters of iron-induced chemiluminescence. It is shown that the introduction of cadmium for 7 days reduces the duration of the latent period of chemiluminescence in the brain, liver and blood plasma suggesting the depletion of endogenous antioxidant defense. Co-exposure to carnosine and cadmium led to significant increase in the level of antioxidant protection in plasma, liver and

brain of animals. Carnosine also prevented the increase of lipid hydroperoxides in the brain and prevented the development of lipid peroxidation content in liver and plasma of animals. Mechanism of the protective effect of carnosine in conditions of oxidative stress inducing by cadmium administration shown on human neuroblastoma SH-SY5Y cell culture. Adding to the incubation medium to a final concentration of cadmium 5 μM reduced cell viability of a culture that was determined by MTT assay; simultaneously introducing carnosine (0.25 mM final concentration) with cadmium resulted in increased cell viability at 24 hours of incubation. Thus carnosine in a final concentration of 1 mM effectively prevented the development of necrotic lesions neuroblastoma cells, inhibiting the formation of reactive oxygen species as measured by flow cytometry. The results indicate the ability of carnosine to prevent the development of oxidative stress under the toxic action of cadmium.

Keywords: *carnosine, cadmium, oxidative stress, Wistar rats, iron-induced chemiluminescence, human neuroblastoma SH-SY5Y, ROS, viability, cell death.*

Сведения об авторах

Куликова Ольга Игоревна — мл. науч. сотр. лаборатории клинической и экспериментальной нейрoхимии ФГБНУ “Научный центр неврологии”, аспирантка кафедры системной экологии экологического факультета РУДН. Тел.: 8-495-490-24-09; e-mail: posibilidad@mail.ru

Федорова Татьяна Николаевна — докт. биол. наук, зав. лабораторией клинической и экспериментальной нейрoхимии ФГБНУ “Научный центр неврологии”. Тел.: 8-495-490-24-09; e-mail: tnf51@bk.ru

Стволинский Сергей Львович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории клинической и экспериментальной нейрoхимии ФГБНУ “Научный центр неврологии”. Тел.: 8-495-490-24-09; e-mail: slstvolinsky@mail.ru

Орлова Валентина Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры системной экологии экологического факультета РУДН. Тел.: 8-495-952-89-01; e-mail: bte2005@mail.ru

Иноземцев Анатолий Николаевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории “Эволюция механизмов памяти” кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-01; e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.8

НЕЙРОТРОФИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ОНТОГЕНЕЗЕ И ПРИ РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Е.А. Рудницкая¹, Н.Г. Колосова^{1,2}, Н.А. Стефанова^{1,*}¹ Институт цитологии и генетики, СО РАН; Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;² Новосибирский государственный университет; Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: stefanovan@bionet.nsc.ru

Нейротрофические факторы мозга играют ключевую роль в онтогенетических изменениях функционирования нервной системы. За шесть десятилетий активных исследований структуры и функций белков семейства нейротрофинов наиболее полно охарактеризованы фактор роста нервов (NGF) и мозговой нейротрофический фактор (BDNF). Сложная координация синтеза, транспорта, секреции и взаимодействия пронеуротрофинов и зрелых нейротрофинов, а также их рецепторов — белков семейства Trk — тирозинкиназы и p75^{NTR}-рецептора — обуславливает широкий спектр их биологической активности. В эмбриогенезе нейротрофические факторы принимают участие в становлении нервной системы, регулируя как деление, дифференцировку, выживание, миграцию и рост нейронов и их отростков, так и запуск апоптоза. В зрелом мозге нейротрофины участвуют в поддержании функционального состояния нейронов и глиальных клеток, регуляции синаптической пластичности. Закономерно, что развитие характерных для старения и нейродегенеративных заболеваний процессов тесно связано с изменением нейротрофического обеспечения головного мозга, обусловленным как нарушением метаболизма нейротрофинов, так и модификацией их доступности вследствие изменения микроокружения нейронов. Как перспективный подход к терапии нейродегенеративных расстройств рассматривается восстановление баланса нейротрофических факторов в мозге.

Ключевые слова: нейротрофические факторы, мозг, нейродегенеративные заболевания, старение, онтогенез, обзор.

Нейротрофические факторы мозга обеспечивают формирование и поддержание активности нейрональных клеток и нейронных сетей в онтогенезе, выступая, таким образом, как одно из центральных звеньев в функционировании нервной системы [1]. Нейротрофины составляют семейство секреторных белков, в которое входят фактор роста нервов (NGF), мозговой нейротрофический фактор (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и нейротрофин-4 (NT-4) [2]. Синтезируются нейротрофические факторы в виде белков-предшественников, пронеуротрофинов. В онтогенезе зрелые нейротрофины, взаимодействуя со специфическими тирозинкиназными (Trk) рецепторами, регулируют деление клеток, их миграцию, дифференцировку, установление и поддержание активности межклеточных контактов в нервной системе [3]. Пронеуротрофины, взаимодействуя с универсальным p75^{NTR}-рецептором, регулируют запуск апоптоза [4]. Сложная координация синтеза, транспорта, секреции и взаимодействия нейротрофинов и их рецепторов, а также разнообразие сплайсинговых форм этих белков обуславливают широкий спектр их биологической активности.

Снижение функциональных возможностей мозга, в том числе способности к обучению и памяти, рост вероятности развития нейродегенеративных заболеваний — неизбежные проявления старения,

критический возраст манифестации и масштабы которых существенно различаются [5, 6]. Развитие характерных для старения и нейродегенеративных заболеваний процессов тесно связано с изменением нейротрофического обеспечения головного мозга, обусловленным как нарушением метаболизма нейротрофинов, так и модификацией их доступности вследствие изменения микроокружения нейронов [7]. В условиях увеличения продолжительности жизни и связанного с ним роста числа людей, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, выяснение фундаментальных механизмов, инициирующих нарушения нейротрофического обеспечения мозга с возрастом, а также разработка способов его коррекции приобрели особую актуальность.

Общая характеристика семейства нейротрофинов и их рецепторов

Впервые белок семейства нейротрофинов, NGF, был обнаружен нейробиологом Леви-Монтальчини и эмбриологом Гамбургером в 1953 г. [8] и выделен биохимиком Коэном в 1956 г. [9]. За шесть десятилетий активного исследования структуры и функций нейротрофических факторов и их рецепторов были хорошо охарактеризованы два белка семейства нейротрофинов — NGF и BDNF [1]. Как и большинство трофических факторов, нейротрофины синтезируются в эндоплазматическом ретику-

луме в виде белков-предшественников, пронеуротрофинов (proNGF и proBDNF), образующих прочно связанные дисульфидными мостиками гомодимеры [10]. Про-домены нейротрофинов необходимы для приобретения ими правильной конформации и эффективного внутриклеточного транспорта белков [11], осуществляемого с помощью сортина — трансмембранного рецептора, расположенного на мембране аппарата Гольджи [12]. Сортин связывается с про-доменами нейротрофинов и осуществляет их корректную сортировку в транспортные везикулы. Транспорт мРНК нейротрофинов, в частности, *BDNF*, зависит от сплайсингового варианта: мРНК с короткой 3'-нетранслируемой областью транслируются в теле нейрона, поддерживая базальный уровень *BDNF*, а мРНК с длинной 3'-нетранслируемой областью транспортируются в дендриты, где происходит трансляция [13].

Решающую роль во взаимодействии нейротрофических факторов с рецепторами и в их последующей биологической активности играет протеолитическое расщепление пронеуротрофинов [3]. Димерные пронеуротрофины либо секретируются в виде белков-предшественников, либо подвергаются посттрансляционной обработке с отщеплением N-концевого про-домена и высвобождением зрелого димерного белка (mNGF или mBDNF). Про-домены нейротрофинов также подвергаются протеолитическому расщеплению, за исключением *BDNF*, у которого отщеплённый про-домен секретируется вместе со зрелой формой белка [2, 11].

В «не-нейрональных» тканях все нейротрофины секретируются конститутивно, для нейронов же наряду с конститутивной секрецией характерна зависящая от нейрональной активности регулируемая секреция *BDNF* и *NGF*. При этом зрелая форма нейротрофинов секретируется конститутивно, а пронеуротрофины — регулируемо [14, 15]. Так, в ответ на физиологические стимулы, такие, как вызванная долговременной депрессией низкочастотная стимуляция, секретируется незрелая форма *BDNF*. Внеклеточный proBDNF подвергается гидролизу тканевым активатором плазминогена, в результате чего происходит отщепление про-домена и высвобождение зрелого нейротрофина. Усиление секреции тканевого активатора плазминогена в ответ на долговременную потенциацию обеспечивает увеличение содержания зрелой формы *BDNF* во внеклеточном пространстве. Внеклеточный гидролиз proBDNF необходим для индукции долговременной потенциации, а внутриклеточный — участвует в её поддержании. Регулируемая секреция *BDNF* также вовлекается в NMDA-зависимые формы синаптической пластичности [12, 15].

Специфическими рецепторами зрелых нейротрофинов являются белки семейства Trk — тирозинкиназы. При этом *NGF* преимущественно связывается с TrkA, *BDNF* и NT4 — с TrkB, а NT3 — с TrkC и, с меньшей аффинностью, с TrkA [2, 3]. В ре-

зультате взаимодействия с нейротрофином Trk-рецептор димеризуется, аутофосфорилируется, запускает сигнальные каскады, направленные на деление, выживание, дифференцировку нервных клеток и рост их отростков (рисунок), и затем подвергается эндоцитозу. Эндоцитозные пузырьки либо встраиваются обратно в клеточную мембрану, обеспечивая рециркуляцию Trk-рецепторов, либо формируют сигнальные эндосомы, свойства которых меняются после интернализации и во время ретроградного транспорта [16]. Это становится причиной различия сигнальных каскадов, запускаемых активированными Trk-рецепторами с поверхности клетки и из сигнальной эндосомы [15]. Динамическое равновесие встраивания в мембрану и ретроградного транспорта Trk-рецепторов определяет силу и продолжительность клеточного ответа на нейротрофические факторы [17].

Помимо полноразмерной формы Trk-рецепторов (Full Length Trk, FL-Trk), в нейронах присутствуют образованные в результате альтернативного сплайсинга укороченные формы Trk-рецепторов, у которых отсутствует внутриклеточный тирозинкиназный домен [18]. Укороченные формы Trk-рецепторов являются конкурентными ингибиторами FL-Trk-рецепторов: их связывание с соответствующими нейротрофинами снижает доступность лигандов для FL-Trk-рецепторов, а в результате их димеризации с полноразмерными рецепторами образуются нефункциональные гетеродимеры [17, 19].

Все зрелые нейротрофины также связываются с трансмембранным рецептором p75^{NTR}, принадлежащим к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли TNF. Однако аффинность связывания зрелых нейротрофинов с p75^{NTR}-рецептором существенно ниже, чем при их взаимодействии с Trk-рецепторами [20]. Принципиально важно, что p75^{NTR}-рецептор со значительно более высокой аффинностью связывает пронеуротрофины, и это взаимодействие регулирует запуск апоптоза (рисунок) [2, 3]. После связывания с лигандом p75^{NTR} димеризуется, подвергается расщеплению α-секретазой с высвобождением внеклеточного домена и C-концевого фрагмента и дальнейшему внутриклеточному расщеплению γ-секретазой с высвобождением и фосфорилированием внутриклеточного домена [21, 22]. p75^{NTR} содержит два сайта фосфорилирования: остатки тирозина в 337 и 366 позициях внутриклеточного домена. Выживанию нейронов способствует фосфорилирование тирозина в позиции 337, а запуску апоптоза — в позиции 366 [23, 24].

p75^{NTR} не обладает собственной каталитической активностью [25], но в активированном состоянии способен запускать различные сигнальные пути, при этом выбор конкретного каскада определяется мембранным окружением рецептора. Так, p75^{NTR}, взаимодействуя с Trk-рецепторами, потенцирует их влияние на выживание нейронов и рост отростков; с сортином — запускает внут-

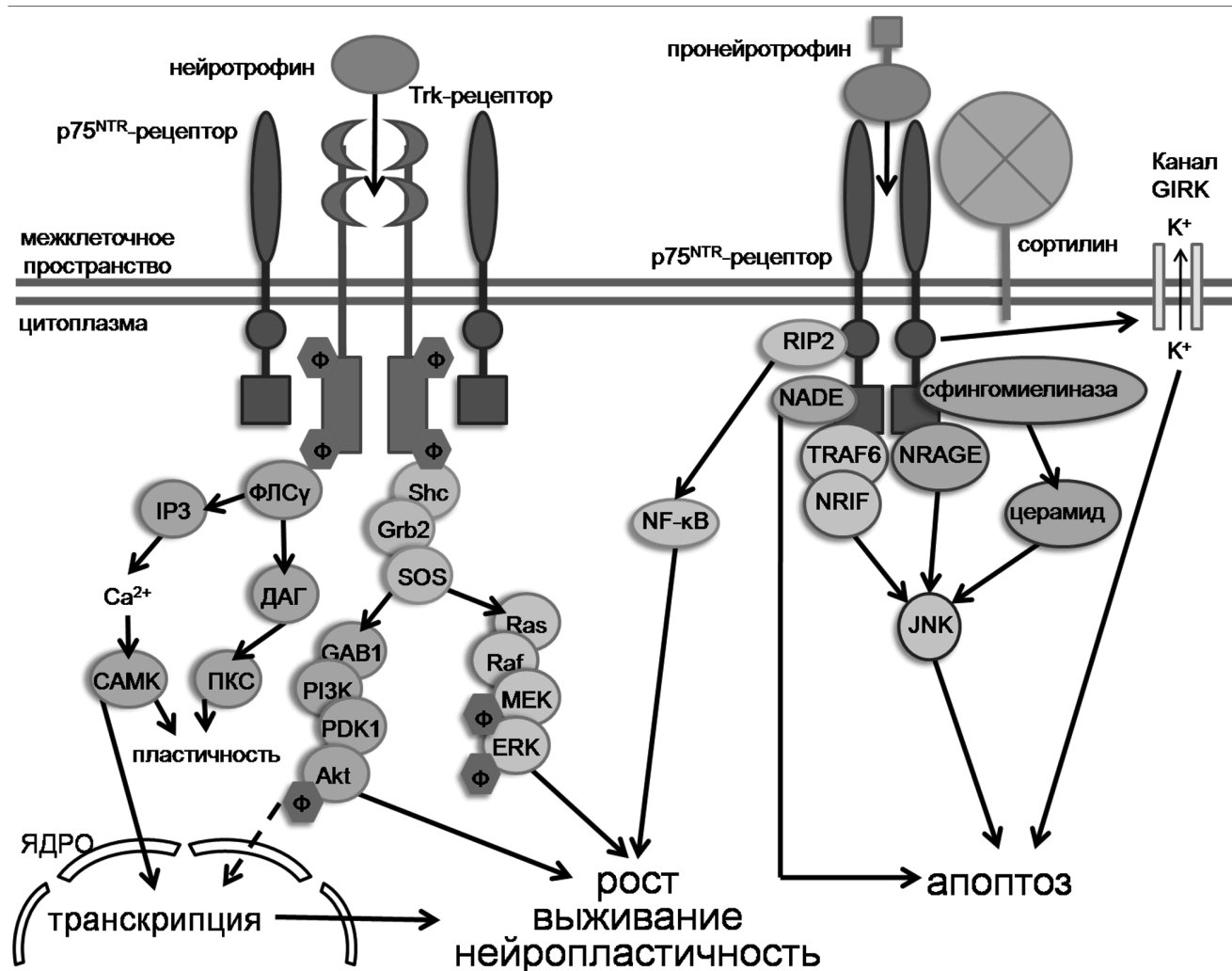


Рисунок. Сигнальные каскады, запускаемые взаимодействием нейротрофинов и их рецепторов. Связывание нейротрофина с внеклеточным доменом Trk-рецептора приводит к димеризации рецептора, активации внутриклеточного тирозинкиназного домена и аутофосфорилированию тирозиновых остатков, которые становятся местами связывания с адаптерными белками. К фосфорилированным тирозинам присоединяется адаптерный белок Shc, который, в свою очередь, вовлекает в каскад белок Grb2. Shc-Grb2 активируют путь Ras-MAPK через SOS-белок, а также путь PI3K-Akt через белок GAB1. Фосфорилирование других тирозинов вовлекает в каскад ФЛСγ, что приводит к образованию инозитолтрифосфата и диацилглицерина, а также повышению внутриклеточного уровня Ca²⁺ и запуску дальнейших сигнальных каскадов — активации CAMK и PKC. Взаимодействие рецептора p75^{NTR} с Trk-рецепторами приводит к усилению Trk-опосредованных сигнальных путей PI3K-Akt. Запускаемые Trk-рецептором сигнальные пути контролируют различные аспекты функционирования клетки, включая выживание, дифференцировку, рост и синаптическую пластичность. Также p75^{NTR} может способствовать выживанию клеток, активируя NF-κB за счёт ассоциации между RIP2 и TRAF6. В то же время, в ответ на связывание с пронейротрофином p75^{NTR}-рецептор индуцирует сфингомиелилазу и взаимодействует с белками NRAGE, TRAF6 и NRIF, что приводит к активации JNK и апоптозу. Также выход внутриклеточного калия через GIRK-каналы и взаимодействие активированного p75^{NTR}-рецептора с белком NADE способствуют запуску апоптоза.

Обозначения: Akt — протеинкиназа B; CAMK — Ca²⁺/кальмодулин-зависимая протеинкиназа; ERK — внеклеточная сигнал-регулируемая киназа; GAB1 — ассоциированный с Grb2 белок-1; GIRK — связанный с G-белком внутренне ректифицирующий калиевый канал; Grb2 — белок, связанный с рецептором ростовых факторов 2; IP3 — инозитол-1,4,5-трифосфат; JNK — c-Jun-N-концевая киназа; MEK — киназа митоген-активируемой протеинкиназы; NADE — ассоциированный с p75^{NTR} белок, запускающий клеточную гибель; NF-κB — ядерный фактор κB; NRAGE — гомолог ассоциированного с меланомой антигена; NRIF — фактор, взаимодействующий с рецептором нейротрофинов; PDK1 — 3-фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа 1; PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; Raf — киназа MEK; Ras — малая ГТФаза; RIP2 — взаимодействующая с рецептором серинтреонинкиназа 2; Shc — адаптерный белок, содержащий домен Src гомологии; SOS — фактор обмена гуаниннуклеотида для Ras-белка; TRAF6 — фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей; ДАГ — диацилглицерин; PKC — протеинкиназа C; Ф — фосфат; ФЛСγ — фосфолипаза Cγ

рикеточный каскад, приводящий к апоптозу; с Nogo-R (рецептором к ретикулону-4, гликопротеину миелина) и Lingo-1 (функциональным компонентом Nogo-R-сигнального комплекса) — ингибирует регенерацию аксонов. Запуск внутриклеточным доменом p75^{NTR} сигнальных путей, регу-

лирующих апоптоз, может происходить не только при активации рецептора, но и конститутивно [26, 27].

Коэкспрессия p75^{NTR} с Trk-рецепторами увеличивает аффинность и специфичность их связывания с соответствующими нейротрофинами [4], однако вопрос о структуре комплекса p75^{NTR}-Trk-

нейротрофин остаётся открытым. Известно, что для образования высокоаффинного комплекса не требуется лиганд-связывающий домен $p75^{NTR}$ -рецептора [28]. Возможно, $p75^{NTR}$ оказывает на Trk-рецепторы аллостерическое действие. Помимо этого, $p75^{NTR}$ замедляет интернализацию и убиквитинирование комплекса TrkA-NGF, продлевая нахождение TrkA-рецептора на клеточной мембране [11, 27]. В отсутствие нейротрофинов $p75^{NTR}$ связывается с β -амилоидом и DR6 (белком, принадлежащим к суперсемейству TNF и активирующим апоптоз), что приводит к формированию олигомерного комплекса доменов смерти, активации каспазы-3 и запуску апоптоза [29].

Сортилин также способен связывать пронеуротрофины, но с низкой аффинностью. Однако взаимодействие внеклеточных доменов сортилина и $p75^{NTR}$ приводит к образованию рецепторного комплекса, который способен связывать пронеуротрофины в субнаномолярных концентрациях, при этом зрелый домен пронеуротрофина связывается с $p75^{NTR}$, а про-домен — с сортилином. Именно через комплекс $p75^{NTR}$ -сортилин пронеуротрофины вызывают проапоптотические эффекты [20, 30].

Рецепторы нейротрофинов расположены на пре- и постсинаптической мембранах, на мембране тела нейрона и вдоль его аксона [12]. TrkA экспрессируется главным образом в сенсорных и симпатических нейронах периферической нервной системы (ПНС), в мозжечке и в популяциях холинергических нейронов коры, перегородки и базальных отделов переднего мозга [31, 32]. TrkB экспрессируется почти всеми нейронами центральной нервной системы (ЦНС), а также астроцитами [33, 34]. TrkC присутствует на мембране нейронов и шванновских клеток мозжечка и коры головного мозга, а также на синаптических мембранах мотонейронов [31, 35]. $p75^{NTR}$ широко экспрессируется в ЦНС и ПНС как нейронами, так и глиальными клетками, в том числе — активированными астроцитами [32].

Роль нейротрофических факторов и их рецепторов в онтогенетических изменениях нервной системы

Нейротрофические факторы играют ключевую роль в определении судьбы нейронов в эмбриогенезе. Они способствуют пролиферации, дифференцировке и росту нервных клеток и их отростков, а также выживанию и запуску клеточной гибели нейронов, образовавших и не образовавших, соответственно, связи с клетками-мишенями [34]. В некоторых ганглиях ПНС и определённых областях ЦНС апоптозу подвергается до 50% нейронов; при этом гибнущие апоптозом нейроны способствуют пролиферации соседних клеток [36].

Гибель нейронов происходит при замыкании нервной пластинки в нервную трубку, элиминировании функционирующих на определённых этапах

эмбриогенеза сигнальных центров. Апоптозу подвергаются нейроны, отростки которых не смогли образовать функционально правильных связей, а также клетки с анеупloidией и другими дефектами репликации и митоза [36]. Апоптоз избыточных нейронов, образованных в эмбриогенезе, необходим для оптимизации размеров нервной системы [34].

Ключевую роль в запуске программируемой клеточной гибели, как отмечалось выше, играют взаимодействие пронеуротрофинов с $p75^{NTR}$ -рецептором и образование лиганд-рецепторного комплекса с сортилином. $p75^{NTR}$ опосредует клеточную гибель в основном постмитотических нейронов. В то же время в делящихся клетках $p75^{NTR}$ запускает сигнальные каскады, способствующие клеточному выживанию. В шванновских клетках BDNF, связываясь с $p75^{NTR}$, контролирует их миграцию вдоль аксона [27].

Зависимость выживания и развития нейронов от нейротрофинов в ПНС и ЦНС различна: нейротрофические факторы, секретирующиеся клетками-мишенями, необходимы для выживания сенсорных и симпатических нейронов в ПНС, в то время как в ЦНС нейротрофины не являются необходимыми для выживания клеток, но поддерживают функционирование нейронов. Различия в пути развития нейронов ПНС и ЦНС в отсутствие нейротрофических факторов и в ответ на них может объяснять разница в экспрессии рецепторов нейротрофинов. В отсутствие лигандов TrkA- и TrkC-рецепторы конститутивно запускают сигнальный путь программируемой клеточной гибели нейронов, в то время как отсутствие BDNF, лиганда TrkB-рецептора, к апоптозу не приводит [37]. Причиной различного влияния отсутствия нейротрофинов на выживаемость нейронов может являться положение рецепторов на клеточной мембране: колокализация TrkA- и TrkC-рецепторов с $p75^{NTR}$ происходит в липидных рафтах, а TrkB-рецептора — вне липидных рафтов. При взаимодействии TrkA- и TrkC-рецепторов с $p75^{NTR}$ происходит его протеолиз и взаимодействие с колокализованными в рафтах проапоптотическими факторами, в том числе — с комплексом DISC, активация которого приводит к запуску внешнего пути апоптоза [38]. TrkB-рецепторы транслоцируются в липидные рафты только при активации, что способствует повышению синаптической активности [15]. Для запуска каскада клеточной гибели TrkA- и TrkC-рецепторам не требуется наличие тирозинкиназного домена, поэтому укороченная форма Trk-рецепторов также может вносить вклад в этот процесс [37].

В развивающейся нервной системе гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), взаимодействуя с ГАМК_A-рецепторами, служит трофическим сигналом для возбуждающих нейронов: активация ГАМК_A-рецепторов приводит к деполяризации плазматической мембраны, пролиферации, миграции, дифференцировке нейронов и образованию

нервных сетей, а также временному повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Повышенный уровень Ca^{2+} , в свою очередь, облегчает экзоцитоз BDNF. Активация BDNF-TrkB-сигнального пути замедляет эндоцитоз ГМК_A-рецепторов. Таким образом, в развивающихся нейронах устанавливается положительная обратная связь между усилением активности ГМК_A-рецепторов и повышением уровня BDNF. После созревания нейронов активация ГМК_A-рецепторов приводит к гиперполяризации, и петля положительной обратной связи с BDNF исчезает [39].

В эмбриональный период BDNF регулирует формирование нейронов зрительных путей: уровень фосфорилирования TrkB-рецептора, отражающий степень его активности, повышен в нейронах зрительной коры [40]. Также BDNF участвует в формировании нейрональных сетей, ответственных за пищевое поведение, способствует выживанию окситоцинергических нейронов [41]. BDNF и TrkB-рецептор экспрессируются в чёрном веществе головного мозга, запуская сигнальные пути, необходимые для развития и поддержания популяций дофаминергических нейронов [42].

Подавляющее большинство нейронов ПНС образуется из нейрональных клеток нервного гребня. Предшественники нервных клеток образуются в ганглиях ПНС тремя перекрывающимися волнами: первыми образуются предшественники афферентных нейронов проприо- и механорецепторов с миелинизированными аксонами, вторыми — предшественники ноцицепторов и механорецепторов с немиелинизированными аксонами, а третьими — мультипотентные предшественники сенсорных нейронов. Trk-рецепторы необходимы для развития различных типов сенсорных нейронов: TrkA-рецепторы требуются для развития ноцицепторов, TrkB-рецепторы — для механорецепторов, TrkC-рецепторы — для проприорецепторов. Специализация и специфика функционирования сенсорных нейронов во время эмбрионального развития и в зрелом мозге зависят от сигнальных путей, запускаемых различными нейротрофинами через специфические рецепторы [43].

NGF на ранних стадиях эмбриогенеза присутствует в эпидермисе и дерме кожи, регулирует образование ноцицептивных С-волокон [44]. NGF и NT-3 способны активировать TrkA-рецептор, но к формированию сигнальной эндосомы приводит только взаимодействие NGF с рецептором, тогда как комплекс NT-3–TrkA распадается в кислой среде ранних эндосом. Образование NGF происходит только в клетках-мишенях нейронов, NT-3 — в эндотелии сосудов [16]. Для выживания и поддержания незрелого состояния нейронов, аксоны которых ещё не достигли тканей-мишеней, требуется NT-3. Отсутствие этого нейротрофина приводит к преждевременному созреванию нейронов и истощению пула нейрональных клеток-предше-

ственников [43]. По достижении аксонами тканей-мишеней дальнейшее выживание нейронов и направление роста аксонов поддерживаются NGF. Принимая во внимание повышенную специфичность связывания TrkA-рецептора с NGF в присутствии p75^{NTR}-рецептора, полагают, что переключателем специфичности связывания становится p75^{NTR}, контролирующий ответ нейронов на связывание различных нейротрофинов с одним и тем же рецептором [27]. Таким образом, NT-3 вызывает локальные эффекты, направляя рост аксонов сенсорных и симпатических нейронов ПНС к тканям-мишеням, тогда как NGF, повышая экспрессию молекул клеточной адгезии в нейронах, осуществляет более тонкую регуляцию роста аксонов по направлению к клеткам-мишеням [16].

Главной функцией BDNF в зрелом мозге является модулирование синаптической пластичности. Нейротрофин вызывает структурные и функциональные изменения как возбуждающих, так и тормозящих синапсов, вызывает краткосрочные и долговременные эффекты. Различия в эффектах BDNF обусловлены не только его формой (proBDNF и mBDNF оказывают противоположное действие), но и особенностями доставки к нейронам. Быстрое и кратковременное повышение концентрации BDNF приводит к значительной, но непродолжительной активации TrkB-рецептора и, как следствие, к временным эффектам в плане действия на синаптическую пластичность. Хроническое повышение уровня нейротрофина приводит к медленной, но долговременной активации TrkB-рецептора, при этом значительный пул активированных рецепторов рециркулирует обратно к клеточной мембране. Также кратковременное и долговременное повышение концентрации BDNF оказывает различное действие на морфологию синапсов: острое повышение его уровня приводит к удлинению аксонов и набуханию дендритных шипиков, тогда как хроническое повышение — к ветвлению дендритов и образованию на них филоподий [15]. Эффекты, вызываемые BDNF в синапсах, зависят также от типов пре- и постсинаптического нейронов. В возбуждающем глутаматергическом синапсе BDNF способствует активации возбуждающего, но не тормозящего постсинаптического нейрона. В тормозящем ГМК-ергическом синапсе BDNF подавляет синаптическую передачу на возбуждающий постсинаптический нейрон [45]. BDNF модулирует встраивание тормозящих нейронов в нейронные сети ЦНС [40].

Трансляция мРНК *BDNF* и *NTRK2* (гена TrkB-рецептора) может осуществляться в синаптических везикулах, что приводит к локальному повышению уровня их белковых продуктов только в активном синапсе. Таким образом, запуск сигнальных путей активированными TrkB-рецепторами происходит селективно в активных синапсах и не происходит в соседних, неактивных синапсах. Нейрональная

активность способствует дальнейшей встройке содержащих TrkB-рецептор синаптических пузырьков в клеточную мембрану, а также транслокации мРНК TrkB-рецептора в дендриты [15].

BDNF является необходимым регулятором клеточных процессов, лежащих в основе памяти и познания, так как этот белок играет ключевую роль в формировании долговременной потенциации [15] — как её ранней, так и поздней стадии. На ранней стадии долговременной потенциации активация NMDA-рецепторов к глутамату приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Взаимодействие BDNF с TrkB-рецептором также приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} за счет активации фосфолипазы $\text{C}\gamma$. В пресинаптических нейронах активация фосфолипазы $\text{C}\gamma$ усиливает экзоцитоз синаптических везикул, повышая концентрацию глутамата в синаптической щели. Активация сигнального пути BDNF-TrkB приводит к интенсификации транспорта белка постсинаптического уплотнения (PSD-95), необходимого для активации NMDA-глутаматергических рецепторов и обеспечения синаптической пластичности. Эти молекулярные события становятся основой для поздней стадии долговременной потенциации [40]. В то же время, proBDNF, активируя p75^{NTR} , препятствует реконсолидации воспоминаний и способствует их исчезновению [15].

p75^{NTR} играет ключевую роль в ослаблении синаптических связей и развитии долговременной депрессии. Поскольку запускаемые глутаматом сигнальные пути необходимы для формирования долговременной депрессии, p75^{NTR} опосредует свои эффекты через NMDA- и AMPA-рецепторы к глутамату [15]. p75^{NTR} участвует в регуляции роста аксонов: его связывание с пронеуротрофинами модулирует активность белков семейства Rho-ГТФаз, контролирующих реорганизацию актинового цитоскелета, и повышает активность каспазы-3 и каспазы-6 в пределах аксонального конуса роста, что приводит к ретракции аксона, но не приводит к апоптозу. Таким образом, активация p75^{NTR} приводит к разрушению аксонального конуса роста, предотвращая рост аксона в неправильном направлении [27, 34]. В то же время proBDNF, активируя p75^{NTR} -рецептор, ингибирует миграцию нейронов, стимулирует сокращение аксонов, снижает интенсивность роста дендритов и плотность дендритных шипиков [15].

NGF принимает участие в передаче болевой чувствительности (повышает продукцию вещества P, основного нейромедиатора боли). Он необходим для экспрессии специфических для ноцицепции ионных каналов и сенситизации рецепторов. Причина сенситизации ноцицепторов — вызванное NGF быстрое и долговременное увеличение синаптической пластичности между чувствительными и вставочными нейронами. Также NGF является одним из факторов, способствующих дегрануляции тучных клеток, содержащее гранул которых,

в свою очередь, приводит к дальнейшему высвобождению NGF, что становится причиной гипералгезии. В ЦНС сенситизация нейронов, участвующих в передаче и обработке болевой чувствительности, вызывается высвобождаемым активированной микроглией BDNF [44].

BDNF принимает участие в регуляции энергетического метаболизма: в гипоталамусе экспрессия этого нейротрофина высока и строго регулируется энергетическим статусом. Уровень BDNF максимален в вентромедиальном ядре гипоталамуса, регулирующем синтез глюкагона [46]. Повышение уровня глюкозы в крови приводит к быстрому повышению уровня BDNF и TrkB-рецептора в вентромедиальном ядре гипоталамуса [41]. BDNF опосредует анорексигенные эффекты, вызываемые активированной меланокортиновой системой [47]. В паравентрикулярном ядре гипоталамуса, играющем ключевую роль в поддержании гомеостаза [48], BDNF повышает уровни кортикотропин-рилизинг-гормона [49] и урокортина, пептидного гормона из семейства кортиколиберинов. Кортикотропин-рилизинг-гормон и урокортин, в свою очередь, снижают аппетит. В аркуатном ядре гипоталамуса BDNF модулирует синаптическую пластичность нейронов, регулирующих потребление пищи. Он также участвует в регуляции энергетического метаболизма на периферии: синтезируется в гладкой и скелетной мускулатуре и жировой ткани [50, 51]. При этом в белой жировой ткани BDNF вовлечён в регуляцию активации транскрипционной программы бурого жира и, как следствие, термогенеза [41, 52]. Синтезируемый в гепатоцитах BDNF повышает их чувствительность к инсулину, снижая уровень глюкозы в крови. Гедоническая гиперфагия у мутантных по BDNF животных частично объясняется тем, что нарушение запускаемых BDNF сигнальных путей в дофаминергических нейронах покрышки среднего мозга приводит к подавлению активности системы вознаграждения мозга. Введение NGF в желудочки мозга приводит к дозозависимой гипофагии и потере веса [41, 53].

Изменение уровня нейротрофинов является частью нейронального ответа на стероидные гормоны: взаимодействие эстрадиола с эстрогеновыми рецепторами в нейронах и астроцитах приводит к повышению уровня мРНК *BDNF* в нейронах [49]. Активация эстрогеновых рецепторов ГАМК-ергических тормозных нейронов коры мозга эстрадиолом приводит к их торможению и растормаживанию BDNF-экспрессирующих нейронов, что способствует повышению уровня BDNF [54]. Прогестерон повышает продукцию BDNF двумя путями: взаимодействие гормона с ядерными рецепторами приводит к увеличению синтеза нейротрофина, а с мембранными рецепторами — облегчает его секрецию. При травме прогестерон способствует сдвигу соотношения proNGF/mNGF в направлении зрелого нейротрофина [55].

Изменение нейротрофического обеспечения мозга при развитии нейродегенеративных заболеваний

Широкий спектр биологической активности нейротрофинов, их участие в регуляции всех аспектов жизнедеятельности нейронов позволяют предполагать, что изменение нейротрофического обеспечения мозга может являться как причиной, так и следствием развития нейродегенеративных процессов. При нейродегенеративных расстройствах различного генеза наблюдается тенденция к смещению баланса пронеуротрофины/зрелые нейротрофины в направлении преобладания незрелых форм белков [56], при этом содержание Trk-рецепторов снижается, а экспрессия $p75^{\text{NTR}}$ -рецептора повышается [57].

Болезнь Альцгеймера (БА) — наиболее распространённая форма сенильной деменции. Ключевыми событиями в патогенезе заболевания становятся гиперпродукция белка-предшественника β -амилоида (APP), накопление его токсических форм и образование амилоидных бляшек в мозге, гиперфосфорилирование тау-белка и формирование нейрофибриллярных клубков, гибель нейронов и синапсов [58, 59]. Закономерно, что развитие характерных для БА процессов сопровождается изменением нейротрофического обеспечения мозга, о чем свидетельствует снижение в мозге, спинномозговой жидкости и крови пациентов с БА уровня BDNF [60, 61]. BDNF принимает участие в регуляции процессинга APP, стимулируя его метаболизм по неамилоидогенному пути, поэтому снижение уровня нейротрофина способствует накоплению токсических форм β -амилоида [62]. В процессинге APP и $p75^{\text{NTR}}$ -рецептора участвуют одни и те же ферменты — α - и γ -секретаза — поэтому следствием гиперпродукции APP становится накопление вызывающего клеточную гибель С-концевого фрагмента белка $p75^{\text{NTR}}$ на клеточной мембране [63]. Кроме того, β -амилоид напрямую связывается с внеклеточным доменом $p75^{\text{NTR}}$ -рецептора [64]. Вызванная этим молекулярным событием активация внутриклеточного домена смерти $p75^{\text{NTR}}$ приводит к гибели нейронов, опосредованной запуском каскадов каспазы-3 и каспазы-8, образованием активных форм кислорода и индукцией окислительного стресса [64, 65]. Характерным событием при развитии БА становится гиперфосфорилирование стабилизирующего микротрубочки тау-белка, что приводит к нарушению аксонального транспорта [66]. Поскольку ретроградный транспорт активированных нейротрофическими факторами Trk-рецепторов играет ключевую роль в запуске сигнальных каскадов выживания нейронов, его нарушение приводит к гибели нейронов [16].

Одними из первых при развитии БА поражаются холинергические нейроны базальных отделов головного мозга [67], основным нейротрофическим фактором для которых является NGF [7]. Показано, что $p75^{\text{NTR}}$ -рецептор коэкспрессируется в этих

же отделах мозга [15]. Изменение баланса proNGF/mNGF в направлении пронеуротрофина и гиперэкспрессия $p75^{\text{NTR}}$ -рецептора способствуют запуску процесса гибели холинергических нейронов. Таким образом, нарушения сигнальных путей нейротрофинов вносят вклад в патогенез БА, связывая гибель холинергических нейронов, амилоидную патологию и таупатию в единый механизм [7]. Однако важно отметить, что развитие БА сопровождается активацией процессов, направленных на компенсацию нарушений нейротрофического обеспечения: увеличением секреции BDNF астроцитами и микроглией в ответ на внеклеточную агрегацию β -амилоида и образование амилоидных бляшек [68, 69].

Болезнь Паркинсона (БП) — нейродегенеративное заболевание, характеризующееся внеклеточной агрегацией белка α -синуклеина с образованием телец Леви, мутацией в гене тау-белка, гибелью дофаминергических нейронов в чёрном веществе головного мозга и снижением содержания дофамина в стриатуме [70]. Гиперэкспрессия α -синуклеина при БП подавляет продукцию нейротрофинов: содержание BDNF и NGF в чёрном веществе головного мозга больных БП снижено [60, 71]. В то же время экспрессия $p75^{\text{NTR}}$ -рецептора, напротив, в нейронах чёрного вещества головного мозга усиливается, что способствует гибели дофаминергических нейронов [72]. При этом уровень BDNF снижен в стриатуме и, в меньшей степени, — во фронтальной коре и мозжечке [73, 74]. Важно отметить, что у пациентов с БП уровень BDNF в спинномозговой жидкости и крови понижен на ранних стадиях заболевания и растёт по мере его прогрессии [75, 76]. При этом на поздних стадиях БП повышение уровня BDNF положительно коррелирует с моторными нарушениями, что может отражать активацию компенсаторной реакции [61].

Болезнь Хантингтона (БХ) вызывает мутация в гене *HTT* транскрипционного фактора хантингтина, приводящая к его агрегации, образованию внутриклеточных включений и, как следствие, нарушению нейронального транспорта [77]. Наиболее выраженные изменения нейротрофического обеспечения при БХ развиваются в стриатуме: уровни BDNF и FL-TrkB-рецептора снижаются, тогда как уровни укороченной формы TrkB-рецептора и $p75^{\text{NTR}}$ -рецептора повышаются [78, 79]. Снижение уровня BDNF также может быть обусловлено нарушением его транскрипции, в регуляции которой участвует хантингтин. Мутация в гене хантингтина, с одной стороны, приводит к нарушению способности белка связываться с промотором II гена *BDNF*, с другой стороны, — к взаимодействию с транскрипционным фактором CBP (белок, связывающий CREB) и подавлению его активности [80]. К снижению содержания BDNF в стриатуме также приводит нарушение аксонального транспорта: синтезированный в коре нейротрофин антероградно транспортируется в подкорковые структуры, в том числе — в стриатум [77].

При боковом амиотрофическом склерозе — нейродегенеративном заболевании, характеризующемся дегенерацией и гибелью мотонейронов — значительно повышено содержание запускающего апоптоз p75^{NTR}-рецептора в мотонейронах [72].

Таким образом, патогенез нейродегенеративных заболеваний тесно связан с нарушением сигнальных путей нейротрофических факторов и баланса пронеуротрофинов и зрелых нейротрофинов, а также их рецепторов. Закономерно, что в последние годы растёт число исследований, направленных на оценку эффективности терапии таких болезней, основанной на восстановлении нейротрофического обеспечения нейронов [81, 82]. Как перспективный подход в этом направлении рассматривается активация Trk-рецепторов их агонистами и снижение активности p75^{NTR}-сигнального пути. Так, активация BDNF/TrkB сигнального пути в чёрном веществе головного мозга при БП приводит к увеличению экспрессии дофаминового рецептора D3, образованию новых дофаминергических волокон и, как следствие, ослаблению симптомов заболевания, т.е. к улучшению моторики и мышечного

тонуса [83, 84]. Активация NGF/TrkA-сигнального пути при механических повреждениях головного и спинного мозга предотвращает вызванный нейротоксинами апоптоз сенсорных и симпатических нейронов [85]. В опытах *in vitro* было показано, что добавление NGF и BDNF активирует ферменты антиоксидантной защиты. Экзогенный NGF повышает экспрессию каталазы и глутатионпероксидазы [86, 87], а экзогенный BDNF стимулирует активность глутатионредуктазы [85]. Снижение активности p75^{NTR}-рецептора при боковом амиотрофическом склерозе способствует выживанию мотонейронов [72]. Восстановление нарушений нейротрофического обеспечения мозга преждевременно стареющих крыс OXYs мелатонином подавило развитие у них признаков БА — накопление токсических форм β -амилоида и гиперфосфорилирование тау-белка [88, 89]. Таким образом, восстановление нейротрофического обеспечения нейронов может рассматриваться как перспективный подход к терапии нейродегенеративных расстройств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов А.Д. Роль NGF и BDNF в регуляции деятельности зрелого мозга // Журн. высш. нерв. деят. 2014. Т. 64. № 2. С. 137–146.
2. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3 and NT4 // Neurotrophic factors / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 3–15.
3. Dechant G., Barde Y.A. The neurotrophin receptor p75^{NTR}: novel functions and implications for diseases of the nervous system // Nat. Neurosci. 2002. Vol. 5. N 11. P. 1131–1136.
4. Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling // F1000Res. 2016. Vol. 5. N 1885. P. 1–9.
5. Jaszberenyi M., Rick F.G., Szalontay L., Block N.L., Zarandi M., Cai R.Z., Schally A.V. Beneficial effects of novel antagonists of GHRH in different models of Alzheimer's disease // Aging. 2012. Vol. 4. N 11. P. 755–767.
6. Tanisawa K., Mikami E., Fuku N., et al. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes // BMC Genomics. 2013. Vol. 14. N 248. P. 1–15.
7. Capsoni S., Tiveron C., Vignone D., Amato G., Cattaneo A. Dissecting the involvement of tropomyosin-related kinase A and p75 neurotrophin receptor signaling in NGF deficit-induced neurodegeneration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. N 27. P. 12299–12304.
8. Levi-Montalcini R., Hamburger V. A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo // J. Exp. Zool. 1953. Vol. 123. N 2. P. 233–287.
9. Cohen S., Levi-Montalcini R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1956. Vol. 42. N 9. P. 571–574.
10. Rafieva L.M., Gasanov E.V. Neurotrophin propeptides: biological functions and molecular mechanisms // Curr. Protein Pept. Sci. 2016. Vol. 17. N 4. P. 298–305.
11. Hempstead B.L. Deciphering proneurotrophin actions // Neurotrophic factors / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 17–32.
12. Bronfman F.C., Lazo O.M., Flores C., Escudero C.A. Spatiotemporal intracellular dynamics of neurotrophin and its receptors. implications for neurotrophin signaling and neuronal function // Neurotrophic factors / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 33–65.
13. Karpova N.N. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity // Neuropharmacology. 2014. Vol. 76. Pt. C. P. 709–718.
14. Cuello A.C., Bruno M.A., Bell K.F. NGF-cholinergic dependency in brain aging, MCI and Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2007. Vol. 4. N 4. P. 351–358.
15. Lu B., Nagappan G., Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction // Neurotrophic factors / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 223–250.
16. Ceni C., Unsain N., Zeinieh M.P., Barker P.A. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death // Neurotrophic factors / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 193–221.
17. Deinhardt K., Chao M.V. Trk Receptors // Neurotrophic factors / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 103–119.
18. Menn B., Timsit S., Represa A., Mateos S., Calothy G., Lamballe F. Spatiotemporal expression of noncatalytic TrkC NC2 isoform during early and late CNS neurogenesis: a comparative study with TrkC catalytic and p75^{NTR} receptors // Eur. J. Neurosci. 2000. Vol. 12. N 9. P. 3211–3223.
19. Eide F.F., Vining E.R., Eide B.L., Zang K., Wang X.Y., Reichardt L.F. Naturally occurring truncated TrkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling // J. Neurosci. 1996. Vol. 16. N 10. P. 3123–3129.
20. Skeldal S., Sykes A.M., Glerup S., Matusica D., Palstra N., Autio H., Boskovic Z., Madsen P., Castrén E., Nykjaer A., Coulson E.J. Mapping of the interaction site between sortilin and the p75 neurotrophin receptor reveals a regulatory role for the sortilin intracellular domain in p75 neurotrophin re-

ceptor shedding and apoptosis // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 52. P. 43798–43809.

21. Zampieri N., Xu C.F., Neubert T.A., Chao M.V. Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. N 15. P. 14563–14571.

22. Sykes A.M., Palstra N., Abankwa D., Hill J.M., Skeldal S., Matusica D., Venkatraman P., Hancock J.F., Coulson E.J. The effects of transmembrane sequence and dimerization on cleavage of the p75 neurotrophin receptor by γ -secretase // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 52. P. 43810–43824.

23. Blöchl A., Blumenstein L., Ahmadian M.R. Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75 // *Eur. J. Neurosci.* 2004. Vol. 20. N 9. P. 2321–2335.

24. Zhang T., Mi Z., Schor N.F. Role of tyrosine phosphorylation in the antioxidant effects of the p75 neurotrophin receptor // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2009. Vol. 2. N 4. P. 238–246.

25. Meeker R.B., Williams K.S. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death // *Neural Regen. Res.* 2015. Vol. 10. N 5. P. 721–725.

26. Majdan M., Lachance C., Gloster A., Aloyz R., Zeindler C., Bamji S., Bhakar A., Belliveau D., Fawcett J., Miller F.D., Barker P.A. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17. N 18. P. 6988–6998.

27. Kraemer B.R., Yoon S.O., Carter B.D. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor // *Neurotrophic factors* / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 121–164.

28. Esposito D., Patel P., Stephens R.M., Perez P., Chao M.V., Kaplan D.R., Hempstead B.L. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 35. P. 32687–32695.

29. Hu Y., Lee X., Shao Z., Apicco D., Huang G., Gong B.J., Pepinsky R.B., Mi S. A DR6/p75(NTR) complex is responsible for β -amyloid-induced cortical neuron death // *Cell Death Dis.* 2013. Vol. 4. N 4. P. 1–8.

30. Nykjaer A., Lee R., Teng K.K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M.S., Jacobsen C., Kliemann M., Schwarz E., Willnow T.E., Hempstead B.L., Petersen C.M. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death // *Nature.* 2004. Vol. 427. N 6977. P. 843–848.

31. Quartu M., Serra M.P., Manca A., Follesa P., Ambu R., Del Fiacco M. High affinity neurotrophin receptors in the human pre-term newborn, infant, and adult cerebellum // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2003. Vol. 21. N 6. P. 309–320.

32. Aboukassim T., Tong X.K., Tse Y.C., Wong T.P., Woo S.B., Neet K.E., Brahimi F., Hamel E., Saragovi H.U. Ligand-dependent TrkA activity in brain differentially affects spatial learning and long-term memory // *Mol. Pharmacol.* 2011. Vol. 80. N 3. P. 498–508.

33. Colombo E., Cordiglieri C., Melli G., Newcombe J., Krumbholz M., Parada L.F., Medico E., Hohlfeld R., Meinel E., Farina C. Stimulation of the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration // *J. Exp. Med.* 2012. Vol. 209. N 3. P. 521–535.

34. Dekkers M.P.J., Nikolettou V., Barde Y.A. Death of developing neurons: New insights and implications for connectivity // *J. Cell Biol.* 2013. Vol. 203. N 3. P. 385–393.

35. Hess D.M., Scott M.O., Potluri S., Pitts E.V., Cisterni C., Balice-Gordon R.J. Localization of TrkC to Schwann cells and effects of neurotrophin-3 signaling at neuromuscular synapses // *J. Comp. Neurol.* 2007. Vol. 501. N 4. P. 465–482.

36. Yamaguchi Y., Miura M. Programmed cell death in neurodevelopment // *Dev. Cell.* 2015. Vol. 32. N 4. P. 478–490.

37. Nikolettou V., Lickert H., Frade J.M., Rencurel C., Giallonardo P., Zhang L., Bibbel M., Barde Y.A. Neurotrophin receptors TrkA and TrkB cause neuronal death whereas TrkB does not // *Nature.* 2010. Vol. 467. N 7311. P. 59–63.

38. Song J.H., Tse M.C., Bellail A., Phuphanich S., Khuri F., Kneteman N.M., Hao C. Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptotic and nonapoptotic signals in non-small cell lung carcinoma cells // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67. N 14. P. 6946–6955.

39. Porcher C., Hatchett C., Longbottom R.E., McAinch K., Sihra T.S., Moss S.J., Thomson A.M., Jovanovic J.N. Positive feedback regulation between γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. N 24. P. 21667–21677.

40. Yoshii A., Constantine-Paton M. Post-synaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity and disease // *Dev. Neurobiol.* 2010. Vol. 70. N 5. P. 304–322.

41. Rios M. Neurotrophins and the regulation of energy balance and body weight // *Neurotrophic factors* / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 283–307.

42. Baquet Z.C., Bickford P.C., Jones K.R. Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. N 26. P. 6251–6259.

43. Marmigère F., Carroll P. Neurotrophin signalling and transcription programmes interactions in the development of somatosensory neurons // *Neurotrophic factors* / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 329–353.

44. Lewin G.R., Lechner S.G., Smith E.S.J. Nerve growth factor and nociception: from experimental embryology to new analgesic therapy // *Neurotrophic factors* / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 251–282.

45. Wardle R.A., Poo M. Brain-derived neurotrophic factor modulation of gabaergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. N 25. P. 8722–8732.

46. Seoane-Collazo P., Fernø J., Gonzalez F., Diéguez C., Leis R., Nogueiras R., López M. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis // *Endocrine.* 2015. Vol. 50. N 2. P. 276–291.

47. Xu B., Goulding E.H., Zang K., Cepoi D., Cone R.D., Jones K.R., Tecott L.H., Reichardt L.F. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor // *Nat. Neurosci.* 2003. Vol. 6. N 7. P. 736–742.

48. Stern J.E. Neuroendocrine-autonomic integration in the paraventricular nucleus: novel roles for dendritically released neuropeptides // *J. Neuroendocrinol.* 2015. Vol. 27. N 6. P. 487–497.

49. Carbone D.L., Handa R.J. Sex and stress hormone influences on the expression and activity of brain-derived neurotrophic factor // *Neuroscience.* 2013. Vol. 239. P. 295–303.

50. Mousavi K., Jasmin B.J. BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. N 21. P. 5739–5749.

51. Noble E.E., Billington C.J., Kotz C.M., Wang C. The lighter side of BDNF // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. Vol. 300. N 5. P. 1053–1069.

52. Wang C., Bombardieri E., Billington C., Levine A., Kotz C.M. Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. Vol. 293. N 3. P. 992–1002.

53. Cassiman D., Denef C., Desmet V.J., Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors // *Hepatology*. 2001. Vol. 33. N 1. P. 148–158.
54. Blurton-Jones M., Tuszyński M.H. Estradiol-induced modulation of estrogen receptor-beta and GABA within the adult neocortex: a potential transsynaptic mechanism for estrogen modulation of BDNF // *J. Comp. Neurol.* 2006. Vol. 499. N 4. P.603–612.
55. Singh M., Su C. Progesterone, brain-derived neurotrophic factor and neuroprotection // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 239. P. 84–91.
56. Espinet C., Gonzalo H., Fleitas C., Menal M.J., Egea J. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a neurotrophic approach // *Curr. Drug. Targets*. 2015. Vol. 16. N 1. P. 20–30.
57. Puglielli L. Aging of the brain, neurotrophin signaling, and Alzheimer's disease: is IGF1-R the common culprit? // *Neurobiol. Aging*. 2008. Vol. 29. N 6. P. 795–811.
58. Morley J.E., Farr S.A. The role of amyloid-beta in the regulation of memory // *Biochem. Pharmacol.* 2014. Vol. 88. N 4. P. 479–485.
59. Stefanova N.A., Kolosova N.G. Evolution of Alzheimer's disease pathogenesis conception // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 4–10.
60. Zhang J., Sokal I., Peskind E.R., Quinn J.F., Jankovic J., Kenney C., Chung K.A., Millard S.P., Nutt J.G., Montine T.J. CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases // *Am. J. Clin. Pathol.* 2008. Vol. 129. N 4. P. 526–529.
61. Teixeira A.L., Barbosa I.G., Diniz B.S., Kummer A. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function // *Biomark. Med.* 2010. Vol. 4. N 6. P. 871–887.
62. Rohe M., Synowitz M., Glass R., Paul S.M., Nykjaer A., Willnow T.E. Brain-derived neurotrophic factor reduces amyloidogenic processing through control of SORLA gene expression // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. N 49. P. 15472–15478.
63. Sothibundhu A., Sykes A.M., Fox B., Underwood C.K., Thangnipon W., Coulson E.J. Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28. N 15. P. 3941–3946.
64. Perini G., Della-Bianca V., Politi V., Della Valle G., Dal-Pra I., Rossi F., Armato U. Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by -amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines // *J. Exp. Med.* 2002. Vol. 195. N 7. P. 907–918.
65. Jakob-Roetne R., Jacobsen H. Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009. Vol. 48. N 17. P. 3030–3059.
66. Niewiadomska G., Baksalerska-Pazera M., Riedel G. Cytoskeletal transport in the aging brain: focus on the cholinergic system // *Rev. Neurosci.* 2006. Vol. 17. N 6. P. 581–618.
67. Contestabile A. The history of the cholinergic hypothesis // *Behav. Brain Res.* 2011. Vol. 221. N 2. P. 334–340.
68. Burbach G.J., Hellweg R., Haas C.A., Del Turco D., Deicke U., Abramowski D., Jucker M., Staufenbiel M., Deller T. Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24. N 10. P. 2421–2430.
69. Kimura N., Takahashi M., Tashiro T., Terao K. Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration // *J. Neurosci. Res.* 2006. Vol. 84. N 4. P. 782–789.
70. Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003. Vol. 991. P. 1–14.
71. Rodrigues T.M., Jerónimo-Santos A., Outeiro T.F., Sebastião A.M., Diógenes M.J. Challenges and promises in the development of neurotrophic factor-based therapies for Parkinson's disease // *Drugs Aging*. 2014. Vol. 31. N 4. P. 239–261.
72. Chen L.W., Yung K.K.L., Chan Y.S., Shum D.K.Y., Bolam J.P. The proNGF-p75^{NTR}-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease // *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets*. 2008. Vol. 7. N 6. P. 512–523.
73. Howells D.W., Porritt M.J., Wong J.Y., Batchelor P.E., Kalnins R., Hughes A.J., Donnan G.A. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra // *Exp. Neurol.* 2000. Vol. 166. N 1. P. 127–135.
74. Allen S.J., Watson J.J., Shoemark D.K., Barua N.U., Patel N.K. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration // *Pharmacol. Ther.* 2013. Vol. 138. N 2. P. 155–175.
75. Scalzo P., Kmmmer A., Bretas T.L., Cardoso F., Teixeira A.L. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease // *J. Neurol.* 2010. Vol. 257. N 4. P. 540–545.
76. Salehi Z., Mashayekhi F. Brain-derived neurotrophic factor concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease // *J. Clin. Neurosci.* 2009. Vol. 16. N 1. P. 90–93.
77. Gauthier L.R., Charrin B.C., Borrell-Pagès M., Dom-pierre J.P., Rangone H., Cordeli res F.P., Mey J.D., MacDonald M.E., Leßmann V., Humbert S., Saudou F. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules // *Cell*. 2004. Vol. 118. N 1. P. 127–138.
78. Ginés S., Bosch M., Marco S., Gavalda N., Díaz-Hernández M., Lucas J.J., Canals J.M., Alberch J. Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain // *Eur. J. Neurosci.* 2006. Vol. 23. N 3. P. 649–658.
79. Zuccato C., Marullo M., Conforti P., MacDonald M.E., Tartari M., Cattaneo E. Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease // *Brain Pathol.* 2008. Vol. 18. N 2. P. 225–238.
80. Zuccato C., Cattaneo E. Huntington's Disease // *Neurotrophic factors* / Eds. G.R. Lewin and B.D. Carter. Berlin: Springer, 2014. P. 357–409.
81. Hernandez-Chan N.G., Bannon M.J., Orozco-Barrios C.E., et al. Neurotensin-polyplex-mediated brain-derived neurotrophic factor gene delivery into nigral dopamine neurons prevents nigrostriatal degeneration in a rat model of early Parkinson's disease // *J. Biomed. Sci.* 2015. Vol. 22. N 59. P. 1–14.
82. Razgado-Hernandez L.F., Espadas-Alvarez A.J., Reyna-Velazquez P., Sierra-Sanchez A., Anaya-Martinez V., Jimenez-Estrada I., Bannon M.J., Martinez-Fong D., Aceves-Ruiz J. The Transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the effect of dopamine D3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease // *PLOS One*. 2015. Vol. 10. N 2. P. 1–25.
83. Guillin O., Diaz J., Carroll P., Griffon N., Schwartz J.-C., Sokoloff P. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization // *Nature*. 2001. Vol. 411. N 6833. P. 86–89.
84. Liang J., Zheng X., Chen J., Li Y., Xing X., Bai Y., Li Y. Roles of BDNF, dopamine D3 receptors, and their interac-

tions in the expression of morphine-induced context-specific locomotor sensitization // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011. Vol. 21. N 11. P. 825–834.

85. *Rangasamy S.B., Soderstrom K., Bakay R.A., Kordower J.H.* Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease // *Recent advances in Parkinson's disease translational and clinical research* / Eds. A. Björklund and M.A. Cenci. Oxford: Elsevier, 2010. P. 237–264.

86. *Sampath D., Perez-Polo R.* Regulation of antioxidant enzyme expression by NGF // *Neurochem. Res.* 1997. Vol. 22. N 4. P. 351–362.

87. *Sato T., Yamagata T., Ishikawa Y., Yamada M., Uchiyama Y., Hatanaka H.* Regulation of reactive oxygen species by nerve growth factor but not Bcl-2 as a novel mechanism of protection of PC12 cells from superoxide anion-induced death // *J. Biochem.* 1999. Vol. 125. N 5. P. 952–959.

88. *Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Kiseleva E., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G.* Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology // *J. Pineal Res.* 2015. Vol. 59. N 2. P. 163–177.

89. *Rudnitskaya E.A., Maksimova K.Y., Muraleva N.A., Logvinov S.V., Yanshole L.V., Kolosova N.G., Stefanova N.A.* Beneficial effects of melatonin in a rat model of sporadic Alzheimer's disease // *Biogerontology.* 2015. Vol. 16. N 3. P. 303–316.

Поступила в редакцию 15.09.2016

Принята в печать 15.09.2016

PHYSIOLOGY

BRAIN NEUROTROPHIC SUPPLEMENTATION IN ONTOGENESIS AND DURING DEVELOPMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

E.A. Rudnitskaya¹, N.G. Kolosova^{1,2}, N.A. Stefanova^{1,}*

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;*

² *Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia;*

**e-mail: stefanovan@bionet.nsc.ru*

Neurotrophic factors play a key role in ontogenetic changes of the nervous system functioning. In six decades of active studying of neurotrophic structure and function the most well characterized neurotrophic factors among other neurotrophins are nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Complex coordination of synthesis, transport, secretion and interaction of proneurotrophins and mature neurotrophins as well as its receptors — tyrosine kinase Trk receptors and p75^{NTR} receptor — leads to a wide range of its biological activities. In embryogenesis, neurotrophic factors are involved in the formation of the nervous system regulating the division, differentiation, survival, growth and migration of neurons and neurites as well as the apoptosis. In the mature brain neurotrophins are involved in maintaining the functional state of neurons and glial cells and regulation of synaptic plasticity. Therefore, development of processes associated with advanced age and neurodegenerative diseases is closely related to impairments of neurotrophic supplementation of the brain. Such impairments may be caused by disturbances in neurotrophic metabolism as well as modification of its availability due to changes in neuronal microenvironment. Restoring of the balance of neurotrophic factors is considered as a promising approach to the treatment of neurodegenerative disorders.

Keywords: *neurotrophic factors, brain, neurodegenerative diseases, aging, ontogenesis, review.*

Сведения об авторах

Рудницкая Екатерина Александровна — аспирант сектора молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80; e-mail: rudnickaya@bionet.nsc.ru

Колосова Наталья Гориславовна — докт. биол. наук, проф., зав. сектором молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80; e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Стефанова Наталья Анатольевна — докт. биол. наук, ст. науч. сотр. сектора молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80; e-mail: stefanovan@bionet.nsc.ru

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 57.024

О СВЯЗИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК
ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ С УРОВНЕМ ИНТЕЛЛЕКТА

Е.П. Станкова*, И.Ю. Мышкин

*Кафедра физиологии человека и животных, факультет биологии и экологии, Ярославский государственный университет имени П.Г. Демидова; Россия, 150057, г. Ярославль, Матросова пр-д, д. 9***e-mail: stankova-katia@yandex.ru*

Работа посвящена изучению связи между индивидуальными особенностями электроэнцефалограммы (ЭЭГ), зарегистрированной в состоянии спокойного бодрствования, и уровнем невербального интеллекта. В исследовании приняли участие 77 студентов Ярославского государственного университета имени П.Г. Демидова. При анализе связей IQ со спектральными характеристиками тета-, альфа- и двух диапазонов бета-ритмов ЭЭГ выявлено, что амплитуда и мощность альфа- и низкочастотного бета-ритмов положительно связаны с успешностью решения теста невербальных интеллектуальных способностей. Разнообразие периодических режимов мозга оценивали с помощью корреляционной размерности ЭЭГ (CD). Корреляционная размерность является количественной характеристикой аттрактора нелинейно-динамической системы, дающей информацию о степени сложности ее поведения. Нами установлено, что величина корреляционной размерности положительно связана с уровнем интеллекта. Для изучения периодичности сигнала ЭЭГ использовали автокорреляционный анализ. Показано, что длительность автокорреллограммы имеет отрицательную связь с IQ, а размах графика автокорреляционной функции положительно связан с коэффициентом интеллекта. Получено регрессионное уравнение, позволяющее прогнозировать уровень невербального интеллекта на основе мощности тета- и бета-ритмов, индексов альфа-ритма, амплитуды и автокорреляционных характеристик сигнала ЭЭГ.

Ключевые слова: ЭЭГ, альфа-ритм, бета-ритм, тета-ритм, автокорреляционный анализ ЭЭГ, корреляционная размерность ЭЭГ, интеллект.

В настоящее время одной из наиболее актуальных проблем психофизиологии считают поиск объективных критериев успешности когнитивной деятельности, в том числе и интеллекта. Начиная с работ Ч. Спирмена, психологи английской школы исследования интеллекта предполагают, что существует некий общий фактор, который влияет на успешность прохождения испытуемым большинства тестов способностей. Ч. Спирмен назвал этот фактор генеральным, или “фактором G”, в работах Р. Кеттелла это — “подвижный интеллект”. На сегодняшний день концепция интеллекта Г. Айзенка является, на наш взгляд, наиболее развитой. В ней наиболее фундаментальный аспект интеллекта, который служит физиологической основой познавательного поведения, был назван биологическим интеллектом [1].

В противоположность социальному и психометрическому интеллекту, биологический мало зависит от влияния среды, а в основном связан с генетически определенными задатками. Логично предположить, что, если существует биологический интеллект, то он каким-то образом связан с особенностями строения или работы головного мозга. Поэтому одной из важнейших проблем физиологии и психофизиологии является определение особенностей функционирования головного

мозга, которые определяют тот или иной уровень интеллекта. В ряде исследований показано, что индивидуальные характеристики электроэнцефалограммы (ЭЭГ) во многом определены генетически и могут быть использованы для изучения когнитивных способностей [2].

Несмотря на большое количество публикаций, отражающих связь когнитивных процессов с особенностями электрической активности мозга, вопрос о существовании чётких электрофизиологических биомаркёров процессов интеллекта далёк от своего решения.

Во-первых, трудности в интерпретации полученных результатов обусловлены использованием различных когнитивных тестов. Особенности электрической активности мозга по-разному влияют на различную тестовую деятельность [3], поэтому в данной работе мы использовали тест свободный от влияния культуры, который не требует ни математических навыков, ни обращения к аппарату долговременной памяти.

Во-вторых, большинство современных исследований, посвященных изучению связи уровня интеллекта с особенностями организации электрической активности мозга, затрагивают лишь спектральные характеристики ЭЭГ [4–7]. Однако спектральные характеристики не дают информа-

ции о периодичности сигнала ЭЭГ, его сложности и временной динамике. Было показано, что в структуре ЭЭГ помимо регулярных составляющих, можно выявить хаотическую составляющую, которая не является шумом и отражает сложность организации электрической активности мозга. Изучать её можно методами нелинейной динамики, в том числе используя корреляционную размерность восстановленного аттрактора ЭЭГ [8]

Современные литературные данные свидетельствуют в пользу того, что фоновая активность мозга во многом определяет характер его вызванной активности [9], поэтому в данной работе мы остановились на изучении электрической активности мозга в состоянии спокойного бодрствования. Целью настоящего исследования стало изучение связи между индивидуальными особенностями ЭЭГ и уровнем интеллекта. Для комплексного изучения ЭЭГ мы применили как линейные, так и нелинейные методы анализа, и связали особенности фоновой электрической активности с успешностью решения теста на интеллект.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 77 человек в возрасте от 19 до 26 лет обоего пола. Все испытуемые были студентами Ярославского государственного университета имени П.Г. Демидова и дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Регистрация ЭЭГ проводилась в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами. Применялся монополярный способ отведения с ипсилатеральным референтным ушным электродом (A1, A2). Восемь пар активных электродов располагались в соответствии с международной системой “10–20” в переднелобных (Fp1, Fp2), лобных (F3, F4), нижнелобных (F7, F8), центральных (C3, C4), теменных (P3, P4), затылочных (O1, O2), височных (T3, T4) и задневисочных (T5, T6) отведениях. Запись проводилась с помощью исследовательского комплекса “Нейрон-Спектр-4/ВПМ” (Нейрософт, Россия). Частота опроса составляла 500 Гц, полоса пропускания от 0,5 до 35 Гц. Сопротивление электродов не превышало 20 кОм. После удаления артефактов на основе визуального анализа записи, она подвергалась четырём видам анализа: спектральному, амплитудному, автокорреляционному и вычислению корреляционной размерности ЭЭГ. Первые три вида анализа были реализованы с помощью программного обеспечения “Нейрон-спектр.NET” (Нейрософт, Россия). Для анализа выбирали 20 эпох продолжительностью 5 сек. Спектральный и амплитудный анализы производили в следующих частотных диапазонах ЭЭГ: тета-ритм (4–8 Гц), альфа-ритм (8–14 Гц), низкочастотный бета-ритм (14–20 Гц), высокочастотный бета-ритм (20–35 Гц). Помимо амплитуд отдельных ритмических составляющих оценивали общую амплитуду сигнала ЭЭГ. Автокорреляционный анализ прово-

дили на отрезках 500 мс. Корреляционная размерность является количественной характеристикой аттрактора нелинейно-динамической системы, дающей информацию о степени сложности ее поведения. Корреляционная размерность ЭЭГ косвенно характеризует разнообразие периодических режимов мозга. Её рассчитывали с помощью программного обеспечения, разработанного в ЯрГУ по алгоритму Грассбергера-Прокаччия [10]. Для вычисления корреляционной размерности восстановленного аттрактора ЭЭГ использовали 40000 отсчетов (1 мин 20 сек чистой записи). На этом отрезке сигнала размещали 800 эпох длительностью 122 мс.

Оценку невербального интеллекта проводили с помощью теста “Домино”. Основным элементом всех тестовых заданий является изображение фишек домино, расположенных в соответствии с различными закономерностями. Одна из фишек (последняя в ряду) “пустая”, обозначается пунктирным контуром. Испытуемый должен был выявить принцип, согласно которому выстроены фишки, и определить ту фишку, которую следует поставить на место, обозначенное пунктиром. Тест “Домино” относится к тестам интеллекта, свободным от влияния культуры и не требует арифметических способностей. Проверку нормальности распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Считали, что данные подчиняются закону нормального распределения, при $p > 0,05$.

Для сокращения количества первичных анализируемых данных ЭЭГ, а также для изучения их структуры применяли факторный анализ. Последующий анализ проводили с данными, для которых главный фактор объяснял более 66% дисперсии значений. Редукцию данных проводили по каждому отведению, а затем по всему исследуемому диапазону ЭЭГ.

Связь между параметрами оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона. Уровень значимости принимали равным $p < 0,05$.

При составлении модели, прогнозирующей уровень интеллекта, применяли множественный регрессионный анализ методом последовательного исключения переменных. Уровень значимости коэффициентов в уравнении составлял $p < 0,05$. Вычисляли коэффициент множественной корреляции и коэффициент детерминации.

Проверку адекватности регрессионной модели проводили методом построения ROC-кривой (receiver operating characteristic). Этот график позволяет оценить точность бинарной классификации. Он показывает зависимость числа истинно положительных примеров от числа ложно отрицательных примеров. Качество регрессионной модели можно оценить на основании площади под ROC-кривой (area under curve, AUC), чем больше площадь, тем лучшей прогностической способностью обладает модель. Построение ROC-кривой, вычисление площади под кривой, чувствительности и специфичности модели производили в программе MedCalc Statistical.

Результаты и обсуждение

Из 77 обследованных нами испытуемых 15 обладали интеллектом выше среднего (>110 баллов по тесту “Домино”, согласно руководству к тесту), один человек обладал интеллектом ниже среднего (<90 баллов). Средний бал интеллекта в выборке составил 104 ± 7 .

При качественной оценке спектров мощности сигнала ЭЭГ мы обнаружили следующую закономерность. У всех испытуемых, обладающих невербальным интеллектом выше среднего, альфа-ритм на ЭЭГ был хорошо выражен, а спектр мощности чаще всего характеризовался бимодальным или полимодальным затылочным и теменным альфа-ритмом. Такие спектры были обнаружены у 11 из 15 обследованных, и лишь у четырех испытуемых можно было наблюдать мономодальный альфа-ритм.

У испытуемых со средним уровнем интеллекта не было выявлено преобладания какого-либо определенного типа спектров альфа-ритма. Таким образом, на основании качественного анализа можно предположить наличие связи между разнообразием генераторов ритмов в альфа-диапазоне ЭЭГ и показателем интеллекта.

При анализе связей уровня интеллекта со спектральными параметрами ЭЭГ было установлено, что IQ был связан с амплитудой, мощностью и индексом альфа-ритма ЭЭГ в затылочных (O1, O2), теменных (P3, P4), центральных (C3, C4), височных (T3, T4) и левом задневисочном (T5) отведениях. Значимые коэффициенты корреляции составили от $+0,25$ до $+0,33$ (рис. 1).

Аналогичные данные были получены для низкочастотного бета-ритма (14–20 Гц). Его амплитуда и мощность были положительно связаны с коэффициентом интеллекта в затылочных (O1, O2), теменных (P3, P4), центральных (C3, C4), левом лобном (F3) и левом задневисочном (T5) отведениях (рис. 2). Коэффициенты корреляции составили от $+0,25$ до $+0,36$.

В обоих случаях максимальное значение коэффициентов корреляции наблюдалось в центральных и теменных отведениях, при этом для правого полушария величина связи была меньше, чем для левого.

При нелинейном анализе ЭЭГ была обнаружена положительная связь уровня интеллекта с разнообразием периодических режимов мозга в левом переднелобном и правом лобном отведении. Коэффициент корреляции Пирсона между результатами теста “Домино” и корреляционной размерностью ЭЭГ составил в обоих случаях $+0,23$. Таким образом, чем более “сложным” был паттерн сигнала ЭЭГ во фронтальных и префронтальных отведениях, тем выше был уровень интеллекта испытуемых.

Положительную связь уровня интеллекта с размахом (амплитудой) графика автокорреляционной функции наблюдали в левых лобном, центральном, теменном и височном отведениях (рис. 3, А, Б). Размах автокорреляционной функции в целом мо-

жет характеризовать степень сходства одного участка ЭЭГ с отрезком той же записи, сдвинутым на определенный промежуток времени. Нами также показана отрицательная связь времени первого пересечения с нулем (рис. 3, В) и максимального интервала автокорреляционной функции с уровнем интеллекта. Эти параметры характеризуют время затухания автокорреляционной функции, и, следовательно, устойчивость периодики. Периодика на автокорреллограмме затухает тем быстрее, чем больше процесс отличается от истинно периодического. Чем более регулярным был альфа-ритм ЭЭГ на коротких временных интервалах, порядка нескольких десятых секунды, и чем чаще изменялась динамика сигнала ЭЭГ испытуемого, тем выше был уровень интеллекта обследованных студентов. Мы предполагаем, что такой характер сигнала ЭЭГ отражает модуляцию альфа-ритма в веретена.

Значимые коэффициенты корреляции IQ со всеми выше описанными параметрами ЭЭГ находились в пределах от $+0,23$ до $+0,36$. Следовательно, каждый из описанных параметров в отдельности может объяснить лишь около 10% дисперсии изучаемого признака. Поэтому для более полной характеристики связи ЭЭГ и IQ целесообразно использовать комплекс показателей сигнала одновременно. Для этого нами было составлено уравнение регрессии. Коэффициент множественной регрессии составил уже $0,59$, а коэффициент детерминации — $0,35$. Таким образом, уравнение объясняет 35 процентов дисперсии коэффициента интеллекта в выборке.

Полученная регрессионная модель, позволяет предсказать уровень интеллекта на основе мощности тета- и бета-ритмов, индексов альфа-ритма, амплитуды и автокорреляционных характеристик сигнала ЭЭГ.

$$IQ = 100,19 - 0,18a - (0,36b - 0,25c) - 0,36d + 0,18e + 13,43f, \quad (1)$$

где a — мощность тета-ритма в отведении F4; b — индекс альфа ритма в отведении C4; c — индекс альфа ритма в отведении T4; d — мощность высокочастотного бета-ритма в отведении T6; e — максимальная амплитуда сигнала ЭЭГ в отведении P3; f — максимальный размах автокорреляционной функции в отведении C3.

Уровень значимости уравнения $p < 0,00002$.

На прогнозируемый уровень интеллекта положительно влияют амплитуда ЭЭГ в правом теменном отведении, уменьшение градиента индекса альфа-ритма от правых центрального к височному отведению и размах автокорреллограммы ЭЭГ в левом центральном отведении. Отрицательно связаны с уровнем интеллекта выраженность тета-ритма в правом лобном отведении и мощность высокочастотного компонента бета-ритма в правом задневисочном отведении на фоновой ЭЭГ испытуемого.

Мы проверили, насколько хорошо модель может разделить испытуемых на два класса — испытуемых со средним интеллектом и с интеллектом

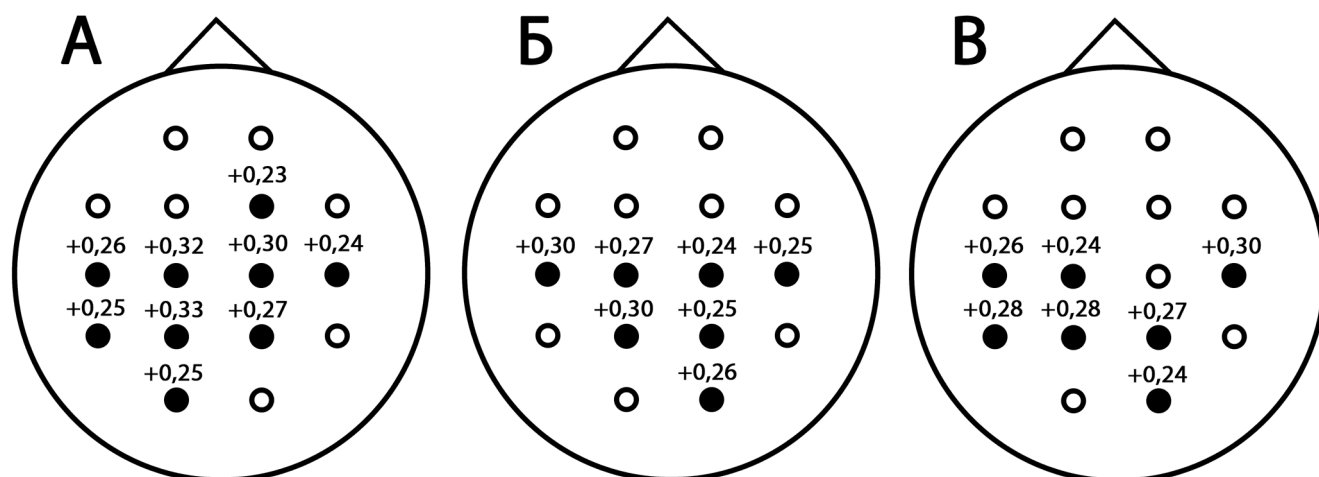


Рис. 1. Коэффициенты корреляции между IQ и максимальной амплитудой альфа-ритма (А), мощностью альфа-ритма (Б), индексом альфа-ритма (В) ($p < 0,05$)

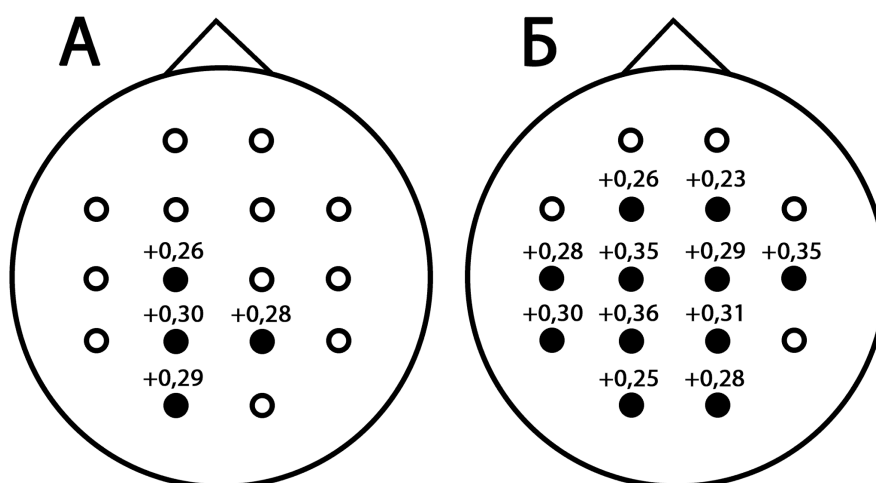


Рис. 2. Коэффициенты корреляции между IQ и амплитудой (А) и мощностью (Б) низкочастотного бета-ритма ($p < 0,05$)

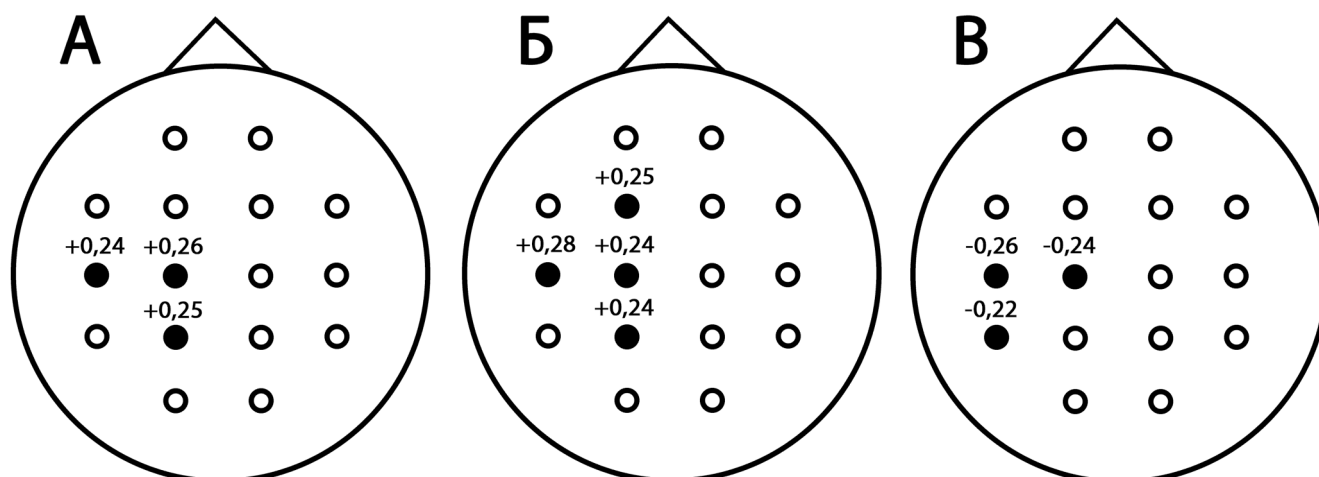


Рис. 3. Коэффициенты корреляции между IQ и максимальным размахом графика функции автокорреляции (А), средним размахом графика функции автокорреляции (Б), временем первого пересечения с нулём графика функции автокорреляции (В) ($p < 0,05$)

выше среднего. Для этого оценили площадь под ROC-кривой. Она составила 0,91, что может характеризовать качество нашей модели как отличное. Значение точки отсечения составило 107, т.е. если модель предсказывает уровень IQ, равный 107, таких испытуемых следует относить в группу с интеллектом выше среднего. При этом параметр чувствительности составил 80, а специфичности — 84. Чувствительность модели показывает, насколько хорошо она может выявить лиц, обладающих высоким интеллектом. Однако слишком чувствительная модель будет относить к группе одаренных даже тех испытуемых, которые таковыми не являются. Специфичность модели характеризует её способность выявлять лиц, не обладающих высоким интеллектом. В данном случае чувствительность и специфичность сбалансированы и достаточно высоки.

Одной из переменных уравнения, позволяющего предсказать уровень интеллекта, являлась максимальная амплитуда сигнала ЭЭГ. Чем больше она была, тем больше был IQ испытуемого. Суммарная амплитуда ЭЭГ зависит как от количества нейронных генераторов ЭЭГ, так и от их фазовой синхронизации [5]. Учитывая современные гипотезы о том, что временная и пространственная структура фоновой активности головного мозга определяют его вызванную активность [9], можно предположить, что высокий уровень синхронизации нейронных популяций в состоянии спокойного бодрствования наилучшим образом подготавливает их к восприятию и обработке информации при активном бодрствовании. Однако частота, на которой происходит синхронизация нейронной активности, имеет существенное влияние на уровень интеллекта.

Полученные данные о положительной связи параметров альфа-ритма и низкочастотного бета-ритма с уровнем интеллекта согласуются с данными литературы о том, что выраженность на фоновой ЭЭГ ритмической составляющей с частотой 8–13 Гц положительно связана с успешностью решения когнитивных задач [7, 11]. В литературе показано, что ритмическая активность в нижнем альфа-диапазоне связана с функцией внимания, в то время как высокочастотный альфа-ритм отражает способность обрабатывать семантическую информацию [12]. Поэтому сдвиг фоновой электрической активности мозга в сторону более медленных ритмов сопровождается снижением продуктивности познавательной деятельности [13]. По данным литературы высокочастотный альфа-ритм и низкочастотный бета-ритм имеют сходные корково-подкорковые генераторы и отражают работу системы “таламус — островковая доля — поясная извилина” [14], поэтому можно предположить, что эти два ритма имеют сходную функциональную роль. Так как процесс решения теста “Домино” требовал осмысленной обработки поступающей информации, можно сделать вывод о том, что ЭЭГ одаренных испытуемых должна характеризоваться выраженной электрической активностью в диапазонах

высокочастотного альфа-ритма и низкочастотного бета-ритма.

В то же время, IQ увеличивается по мере снижения выраженности тета-ритма и высокочастотного бета-ритма на ЭЭГ. Высокочастотный бета-ритм больше характерен для состояния активного бодрствования и находится в реципрокных отношениях с альфа-ритмом. Поэтому наличие на фоновой ЭЭГ высокочастотного бета-ритма говорит об отсутствии синхронизации и нейронных ансамблей. Отрицательная связь уровня интеллекта с выраженностью тета-ритма может быть объяснена с позиций ограничений, которые тета-ритм накладывает на процессы внимания. Установлено, что, в отличие от здоровых испытуемых, подростки, страдающие синдромом дефицита внимания, характеризуются повышенной выраженностью тета-ритма в лобных отведениях, при этом преимущественно с левой стороны [15]. Наши данные об обратном влиянии альфа- и тета-ритмов на уровень интеллекта подтверждают данные, представленные в литературе [16].

В данном исследовании для оценки уровня интеллекта нам было важно найти такие измеряемые величины, которые характеризовали бы системные процессы в головном мозге. Для этих целей мы использовали корреляционную размерность восстановленного аттрактора ЭЭГ. По данным литературы, при помощи этой величины можно судить, насколько генерализованно протекают процессы в головном мозге или насколько вариативна его деятельность [17]. Нами была продемонстрирована положительная связь между величиной корреляционной размерности и уровнем интеллекта. Можно прийти к выводу о том, что величина корреляционной размерности может служить непосредственным показателем уровня интеллекта, так как отражает лабильность нейродинамики мозга. Данные автокорреляционного анализа показали, что чем выше интеллект испытуемых, тем больше электрическая активность мозга отличается от истинно периодической. В целом, на основании анализа связи IQ со спектрами мощности ЭЭГ, с корреляционной размерностью и автокорреляционными характеристиками можно предположить, что сигнал ЭЭГ интеллектуально одаренных испытуемых должен иметь сложную временную структуру.

Таким образом, показано, что амплитуда и мощность альфа- и низкочастотного бета-ритмов фоновой ЭЭГ положительно связаны с уровнем интеллекта, как и корреляционная размерность ЭЭГ во фронтальных отведениях. Амплитуда автокоррелограммы ЭЭГ положительно связана с уровнем невербального интеллекта испытуемого, длительность автокоррелограммы ЭЭГ отрицательно связана с IQ. Получено уравнение регрессии, предсказывающее уровень невербального интеллекта на основании мощности тета- и бета-ритмов, индексов альфа-ритма, амплитуды и автокорреляционных характеристик сигнала ЭЭГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзенк Г.Ю. Интеллект: Новый взгляд // Вопр. психологии. 1995. № 1. С. 111–129.
2. Марютина Т.М. Промежуточные фенотипы интеллекта в контексте генетической психофизиологии // Психология. Журн. Высш. шк. экономики. 2007. Т. 4. № 2. С. 22–47.
3. Новикова С.И. Ритмы ЭЭГ и когнитивные процессы // Соврем. зарубеж. психология. 2015. Т. 4. № 1. С. 91–108.
4. Anokhin A., Vogel F. EEG alpha rhythm frequency and intelligence in normal adults // Intelligence. 1996. Vol. 23. N 1. С. 1–14.
5. Thatcher R.W., North D., Bivera C. EEG and intelligence: Relations between EEG coherence, EEG phase delay and power // Clin. Neurophysiol. 2005. Vol. 116. N 9. P. 2129–2141.
6. Воробьёва Е.В. Интеллект и мотивация достижения: психофизиологические и психогенетические предикторы: Автореф. дисс. ... докт. психол. наук. Ростов-на-Дону, 2007. 47 с.
7. Ahmed S.A., Rani D.E., Sattar S.A. Alpha activity in EEG and intelligence // IJAIT. 2012 Vol. 2. N 1. P. 27–36.
8. Кочубейков Б.К., Сорокина М.А., Пашев В.И. Особенности нелинейной динамики ЭЭГ в различных возрастных группах // Междунар. журн. эксперим. образования. 2013. № 4. С. 1–14.
9. Papo D. Why should cognitive neuroscientists study the brain's resting state? // Front. Hum. Neurosci. 2013. Vol. 7. P. 45.
10. Grassberger P., Procaccia I. Measuring the strangeness of strange attractors // Physica D: Nonlinear Phenomena. 1983. Vol. 9. N 1 P. 189–208.
11. Zoefel B., Huster R.J., Herrmann C.S. Neurofeedback training of the upper alpha frequency band in EEG improves cognitive performance // NeuroImage. 2011. Vol. 54. N 2 P. 1427–1431.
12. Doppelmayr M., Klimesch W., Stadler W., Heine C. EEG alpha power and intelligence // Intelligence. 2002. Vol. 3. N 30. P. 289–302.
13. Van der Meer M.L., Tewarie P., Schoonheim M.M., Douw L., Barkhof F., Polman C.H., Stam C.J., Hillebrand A. Cognition in MS correlates with resting-state oscillatory brain activity: An explorative MEG source-space study // Neuroimage Clin. 2013. Vol. 2. P. 727–734.
14. Sadaghiani S.I., Scheeringa R., Lehongre K., Morillon B., Giraud A.L., Kleinschmidt A. Intrinsic connectivity networks, alpha oscillations, and tonic alertness: a simultaneous electroencephalography / functional magnetic resonance imaging study // J. Neurosci. 2010. Vol. 30. N 30. P. 10243–10250.
15. Hermens D.F., Soei E.X., Clarke S.D., Kohn M.R., Gordon E., Williams L.M. Resting EEG theta activity predicts cognitive performance in attention-deficit hyperactivity disorder // Pediatr. Neurol. 2005. Vol. 32. N 4. P. 248–256.
16. Hanslmayr S., Sauseng P., Doppelmayr M., Schabus M., Klimesch W. Increasing individual upper alpha power by neurofeedback improves cognitive performance in human subjects // Appl. Psychophysiol. Biofeedback. 2005. Vol. 30. N 1. P. 1–10.
17. Меклер А.А. Применение аппарата нелинейного анализа динамических систем для обработки сигналов ЭЭГ // Вестн. новых мед. технологий. 2007. Т. 14. № 1. С. 73–77.

Поступила в редакцию 25.07.2016

Принята в печать 05.09.2016

PHYSIOLOGY

ASSOCIATION BETWEEN INDIVIDUAL EEG CHARACTERISTICS AND LEVEL OF INTELLIGENCE

E.P. Stankova*, I.Y. Myshkin

¹Department of Human and Animal Physiology, School of Biology and Ecology,
Demidov Yaroslavl State University, Matrosova proezd 9, Yaroslavl, 150057, Russia;

*e-mail: stankova-katia@yandex.ru

The aim of the study was to investigate the relationship between individual characteristics the electroencephalogram in the resting state and the level of non-verbal intelligence. The study involved 77 students of Yaroslavl State University. Analyzing the relationship between IQ and spectral parameters of EEG theta, alpha and two sub bands of beta oscillations, we have found out that amplitude and power of alpha band EEG oscillations and low frequency beta band EEG oscillations were positively correlated with test performance. The variety of brain periodic regimes was assessed by using correlation dimension of EEG. The correlation dimension can be used to quantify the degree of complexity of nonlinear dynamical system. It was found to be EEG correlation dimension was positively associated with the level of intelligence. To study the periodicity of the EEG signal was used the autocorrelation EEG analysis. It was shown that autocorrelation duration was negatively associated with non-verbal intelligence level, and autocorrelation amplitude was positively associated with IQ. We have deduced the regression equation which allows to predict the level of non-verbal intelligence based on individual EEG characteristics.

Keywords: EEG, alpha-band oscillations, beta-band oscillations, theta-band oscillations, EEG autocorrelation analysis, correlation dimension, intelligence.

Сведения об авторах

Станкова Екатерина Петровна — аспирант кафедры физиологии человека и животных факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета имени П.Г. Демидова. Тел. 8-485-244-29-28; e-mail: stankova-katia@yandex.ru

Мышкин Иван Юрьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета имени П.Г. Демидова. Тел. 8-485-244-29-28; e-mail: myshkin-iwan@yandex.ru