

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 75 • № 4 • 2020 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

От редактора

Хохлов А.Н. Как наукометрия стала самой важной наукой для исследователей любых специальностей. 195

Обзоры

Чайка С.Ю. Роль периферического окружения рецепторов нейронов в восприятии стимулов сенсорными органами насекомых: факты и гипотезы . . 200

Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты. 210

Селиванова Е.К., Тарасова О.С. Негеномное действие тиреоидных гормонов: роль в регуляции сосудистой системы 226

Моргунова Г.В. Клетки китайского хомячка в биотехнологических и геронтологических исследованиях 237

Оригинальные исследования

Рафикова Г.Ф., Кузина Е.В., Коршунова Т.Ю., Логинов О.Н. Новые штаммы бактерий *Pseudomonas laurentiana* — перспективные агенты для агробиотехнологии. 244

Акиншина Н.Г., Дусчанова Г.М., Азизов А.А., Халмурзаева А.И., Тодерич К.Н. Ксероморфные признаки листьев *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae) в засушливом климате Центральной Азии 251

Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Роль вторичного окислительного стресса в бактерицидном действии антибиотиков. 258

Еникеев Р.Р., Татарина Н.Ю., Захарчук Л.М. Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, доставленных с Международной космической станции . . 265

Воробьева О.В., Исакова Е.Ф., Заец М.А., Мерзеликин А.Ю., Самойлова Т.А. Токсичность иона алюминия для *Daphnia magna* Straus в зависимости от жесткости природной и искусственной воды 273

Мнения

Зворыкин Д.Д. Забота о потомстве у рыбы-ползуна (*Anabas testudineus*): ошибка или утерянные данные? 280

Краткие сообщения

Скоробрехова Е.М. Структура оболочек вокруг метацеркарий трематод *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) во втором промежуточном хозяине 285

Воронцова Ю.Е., Акишина А.А., Черезов Р.О., Симонова О.Б. Функциональная активность арил-гидрокарбонового рецептора в первичных культурах клеток остеогенной саркомы человека 291

Новиков Р.В., Бондаренко Е.А., Малюченко Н.В., Феофанов А.В., Студитский В.М., Шайтан А.К. Определение константы связывания фрагмента белка LANA с нуклеосомой 296

Указатель статей, опубликованных в журнале «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» в 2020 г. 302

CONTENTS

Editorial

- Khokhlov A.N. How scientometrics became the most important science
for researchers of all specialties. 195

Reviews

- Chaika S.Yu. The role of peripheral environment of neuronal receptors
in the perception of stimuli by sensory organs of insects: facts and hypotheses. 200
- Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects 210
- Selivanova E.K., Tarasova O.S. Nongenomic effects of thyroid hormones:
role in regulation of the vascular system. 226
- Morgunova G.V. Chinese hamster cells in biotechnological and gerontological research . . . 237

Research articles

- Rafikova G.F., Kuzina E.V., Korshunova T.Yu., Loginov O.N. New bacterial
strains *Pseudomonas laurentiana* as promising agents for agrobiotechnology 244
- Akinshina N.G., Dushanova G.M., Azizov A.A., Khalmurzaeva A.I.,
Toderich K.N. Xeromorphic features of the leaves of *Liriodendron tulipifera* L.
(Magnoliaceae) in the arid climate of Central Asia. 251
- Akhova A.V., Tkachenko A.G. Role of secondary oxidative stress
in the bactericidal action of antibiotics 258
- Yenikeyev R.R., Tatarinova N.Y., Zakharchuk L.M. Mechanisms of resistance
to clinically significant antibiotics of strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated
from samples delivered from the International Space Station 265
- Vorobieva O.V., Isakova E.F., Zaec M.A., Merzelikin A.Yu., Samoilova T.A.
Acute toxicity of aluminum chloride to *Daphnia magna* Straus depending
on the chemical composition of water 273

Opinion articles

- Zworykin D.D. Parental care in the climbing perch (*Anabas testudineus*):
confusion or lost data? 280

Short communications

- Skorobrekho E.M. Structure of the envelopes that are formed around metacercariae
of the trematode *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) in its second intermediate host. . . 285
- Vorontsova Yu.E., Akishina A.A., Cherezov R.O., Simonova O.B. Functional
activity of aryl hydrocarbon receptor in human osteosarcoma cell cultures. 291
- Novikov R.V., Bondarenko E.A., Malyuchenko N.V., Feofanov A.V.,
Studitsky V.M., Shaytan A.K. Determination of the binding constant of LANA
protein fragment with nucleosome. 296

- Index of papers* published in "Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia" in 2020 302

© Издательство Московского университета,
"Вестник Московского университета", 2020

ОТ РЕДАКТОРА

УДК 002:[57.01-08+573]

Как наукометрия стала самой важной наукой для исследователей любых специальностей**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: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

Излагается точка зрения автора настоящей статьи, участвующего в работе нескольких научных журналов, на современную ситуацию с публикациями статей ученых самых разных специальностей. Рассматриваются два подхода к этой проблеме – «неформальный» (ориентированный только на качество публикуемых рукописей) и «формальный» (учитывающий главным образом наукометрические показатели как авторов, так и журналов). Отмечается непрерывная коммерциализация данного процесса, связанная с появлением огромного количества изданий, требующих от ученых значительных средств на публикацию результатов их исследований. При этом финансовые интересы издателей способствуют снижению требований к рецензированию и редактированию поступающих в редакции статей. Подчеркивается возникшая на современном этапе необходимость соответствующих формальных наукометрических показателей для исследователей, претендующих на гранты, а также на соответствующие должности и звания. По мнению автора, излишнее внимание к таким формальным рейтингам не способствует улучшению результативности научных публикаций, отрицательно влияя, в частности, на процесс слепого рецензирования, грамматику и стилистику рукописей, статистическую обработку приводимых в статьях данных, оформление иллюстраций, а также качество пристатейных списков литературы.

Ключевые слова: научные публикации, редакционная политика, рецензирование, списки литературы, наукометрические показатели, скачивания статей, платные публикации, рейтинги ученых

По основной специальности я геронтолог [1–3], однако, будучи заместителем главного редактора научного журнала биологического факультета МГУ «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология»/«Moscow University Biological Sciences Bulletin» [4–6], много внимания уделяю наукометрическим исследованиям текущей ситуации с научными публикациями как в России, так и за рубежом. В 2014 г. наш журнал выиграл Конкурс по государственной поддержке программ развития и продвижению российских научных журналов в международное научно-информационное пространство, организованный Министерством науки РФ и проведенный «Национальным Электронно-Информационным Консорциумом» (НЭИКОН). Обойдя более 500 журналов-конкурентов, «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» стал одним из двух победителей в разделе «Биология», получив финансовую поддержку на 3 года. По условиям гранта мы должны были провести целый ряд реформ нашего издания, соответствующих требованиям систем глобальных индексов цитирования (Web of Science, Scopus и др.), чем мы и занимались в последующие годы, добившись определенных успехов [6]. В связи с этой победой в конкурсе нас пригласили с докла-

дом [7] на международную конференцию «Научное издание международного уровня – 2015: современные тенденции в мировой практике редактирования, издания и оценки научных публикаций», на которой специалисты (в том числе и представители упомянутых систем глобального цитирования) делились своими идеями, касающимися организации процесса публикации научных работ как в России, так и за рубежом. В течение нескольких последующих лет мы ежегодно (кроме, к сожалению, 2020 г., когда мероприятие было отменено в связи с эпидемиологической обстановкой) принимали участие в работе этих конференций с докладами, посвященными различным аспектам такого процесса [8–11]. Материалы этих симпозиумов оформлялись в виде сборников статей, на основных идеях которых я и хотел остановиться в настоящей редакционной заметке. Кроме того, хотелось бы затронуть некоторые проблемы, упомянутые мной в небольшой статье по материалам доклада на международной конференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology», состоявшейся в июле этого года, несмотря на пандемию коронавируса, в Новосибирске [12]. Хотя последняя работа в основном посвящена наукометрическому анализу

ситуации с публикациями в области геронтологии, мне кажется, что она может представлять интерес и для ученых других специальностей.

За последние десятилетия представления о том, что такое хорошая научная публикация, серьезно изменились. Если раньше, как мне кажется, внимание в основном уделялось содержанию статьи, то сейчас акцент в оценке ее качества резко сместился в сторону рейтинга журнала, в котором она напечатана.

В настоящее время все большее значение для ученых, работающих в самых разных областях науки, приобретают наукометрические показатели (количество цитирований, импакт-фактор, индекс Хирша, показатель SJR и т.д.) эффективности их деятельности. К сожалению, именно такие показатели, а не суть проведенных авторами исследований (или суть сформулированных ими концепций) теперь зачастую являются определяющими для рецензентов из различных фондов, которые предоставляют гранты, обеспечивающие успешное проведение научной работы. В частности, как свидетельствует мой опыт, для того чтобы получить хороший грант на изучение механизмов старения или на разработку модельных систем, обеспечивающих поиск геропротекторов, специалистам в области биологии старения теперь недостаточно представить в научный фонд заявку с описанием своих передовых идей или интересных разработанных методов исследования [12]. В первую очередь рецензенты заявок обращают внимание на «качество» уже опубликованных заявителями работ, а также на соответствующие рейтинги авторов. При этом под «качеством» и «рейтингами» подразумеваются как раз упомянутые выше наукометрические показатели (как исследователей, так и использованных ими для публикации своих результатов журналов). Возникает замкнутый круг: для того, чтобы получить качественные научные результаты, нужны деньги, а добыть их можно, только напечатав значительное количество «крутых» статей.

В сложившейся ситуации «хорошими» журналами в настоящее время считаются лишь издания с высоким импакт-фактором (существуют и альтернативные подходы к такой оценке — например, основанные на количестве скачиваний работ с сайтов соответствующих издательств [7], но они пока не получили широкого распространения). Иначе говоря, чем чаще цитируются статьи из конкретного журнала, тем он «лучше». Соответственно, «хорошими» статьями автоматически считаются публикации в таких журналах, а «плохими» — те, которые в такие издания не попадают. Хотя, на мой взгляд, плохие статьи — это рукописи, написанные на очень слабом уровне в смысле качества идеи, данных, языка, математической обработки результатов, оформления иллюстраций и списка литературы. Большинству исследователей

остается лишь искать способы публикации слабых работ в «хороших» журналах, а потом уже включать ссылки на эти статьи в заявки на гранты. Конечно, можно, как Григорий Перельман, опубликовать доказательство никому не поддающейся гипотезы в Интернете и получить Филдсовскую премию, но для этого, увы, надо быть настоящим гением.

Надо сказать, что и в самых известных «хороших» изданиях достаточно часто встречаются очень слабые статьи, причем некоторые из них потом подвергаются так называемой ретракции. Примеры ретракции встречаются в практике даже таких «монстров» научной публикации, как «Nature» или «The Lancet». При этом возникает вопрос, а каким же образом «плохие» статьи все-таки проникают через мощные барьеры, выстроенные авторитетными редколлегиями и рецензентами, а также целым штатом сотрудников издательств, которые следят за соблюдением правил оформления рукописей. Возможные ответы на этот вопрос были подробно нами рассмотрены ранее [9].

Кстати, что касается журнала «Nature», который для большинства из нас на протяжении многих лет считался эталоном научного издания самой высокой пробы. Как уже упоминалось выше, по своей основной специальности я геронтолог. Недавно меня заинтересовали методические подробности одной работы [13], опубликованной в этом журнале и посвященной влиянию определенной мутации на продолжительность жизни мышей. Мне захотелось узнать, сколько животных использовали в своих экспериментах авторы и как они анализировали их кривые выживания. От этого, естественно, зависит, насколько достоверны полученные результаты. К своему удивлению, ни в самой статье, ни в опубликованных на сайте журнала «Дополнительных материалах» я такой информации не обнаружил. И это статья, которая цитируется более 1800 раз! И это «Nature»!

По-видимому, во многих случаях издания из Q1 (25% журналов с наиболее высокими наукометрическими показателями; публикации в них и обеспечивают ученых высокими рейтингами, необходимыми для получения грантов, а также для переаттестации или прохождения по конкурсу на престижные должности) совсем не обязательно действительно серьезно относятся к рецензированию и редактированию поступающих в редакцию рукописей. Более того, они могут даже являться так называемыми «журналами-хищниками», появление которых связано со все более широким распространением в последнее время статей, публикация которых полностью оплачивается авторами [14, 15]. Такие журналы заинтересованы главным образом в привлечении как можно больших средств от авторов, при этом то, ЧТО публикуется, их не особенно волнует.

Несколько лет назад я уже рассматривал ситуацию с одним небольшим зарубежным издатель-

ством, специализирующемся на журналах биомедицинского профиля [9]. Оно существует немногим более 10 лет и в настоящее время издает 4 научных журнала. Импакт-факторы этих изданий достигают 5–6, т.е. они легко могут быть причислены к «высокореიტинговым» (Q1). Все они функционируют в рамках модели открытого доступа, оплачиваемого авторами. Стоимость публикации статьи варьирует в пределах 3–4 тыс. долларов США. При этом количество публикуемых статей просто огромно. Например, в самом популярном журнале издательства в 2019 г. было опубликовано около 18000 (!) статей, распределенных по 52 (!) выпускам. При этом сроки публикации – от двух недель (!), что полностью исключает возможность нормального рецензирования и редактирования рукописей. Надо сказать, что этот журнал упоминался известным борцом за чистоту научных публикаций Джефффри Биллом [14, 15] на его сайте как весьма вероятный «хищник», однако это, к сожалению, не помешало индексации издания в международных системах глобального цитирования. Хотелось бы подчеркнуть, что нормальное рецензирование статьи (с учетом поиска соответствующих рецензентов, а также многократной переписки между редакцией, авторами и рецензентами) не может, как свидетельствует моя практика, занимать менее 3–4 нед. и достаточно часто может потребовать вплоть до 2–3 мес. кропотливой работы. Не могу представить, как можно осуществить адекватное слепое рецензирование 18000 статей в год!

Надо иметь в виду, что ранжирование журналов возможно проводить достаточно сильно различающимися способами. Чаще всего основываются на показателях «импакт-фактор» (Web of Science) и CiteScore (Scopus). До недавнего времени они были очень сходны – оба базировались на количестве цитирований в конкретном году статей из данного журнала, опубликованных в предыдущие два (Web of Science) или три (Scopus) года. Поэтому и распределение по квартилям Q1–Q4 в этих системах было довольно похожим. Однако с 23 июня 2020 г. Scopus полностью изменил подход к расчету наукометрического показателя CiteScore. При этом была принята во внимание сформулированная мной какое-то время назад идея, которой я поделился с коллегами из Scopus. Как уже отмечено выше, CiteScore любого издания рассчитывался приблизительно по тому же принципу, что и импакт-фактор в Web of Science: количество ссылок в определенном году на статьи, опубликованные в этом журнале в предыдущие 3 года, делилось на количество этих статей. Скажем, для CiteScore-2018 журнала «X» бралось количество цитирований в 2018 г. (в любых изданиях, индексируемых в Scopus) статей 2015–2017 гг. из журнала «X» и полученное число делилось на количество этих статей. Однако при

этом возникала некая «мертвая зона» цитирования работ, опубликованных в этом же году (а это бывает довольно часто, особенно если статья вышла в самом начале года). Скажем, если публикация появилась в январе 2018 г., то ее могли много раз цитировать вплоть до декабря 2018 г. Эти ссылки никогда не учитывались при расчете как CiteScore (Scopus), так и, кстати, импакт-фактора (Web of Science), ибо принимались во внимание только цитирования статей прошлых лет. Новая методика расчета CiteScore позволила устранить проблему «мертвой зоны». Теперь берется число цитирований за 4 года и делится на количество публикаций за эти же 4 года. В результате учитываются ВСЕ ссылки на статьи конкретного издания. Насколько данный подход лучше прежнего, по-видимому, покажет время.

Впрочем, надо заметить, что в очень популярной системе SCImago Journal & Country Rank, основанной на данных Scopus, ранжирование журналов осуществляется по показателю SJR (SCImago Journal Rank) – это тот же индекс цитирования издания, но уже нормированный на рейтинг журналов, в статьях которых осуществляются цитирования. Если рейтинг цитирующих журналов очень высок, то SJR может превышать показатель Citations per document (2 years), являющийся полным аналогом импакт-фактора, если же он достаточно низок, то SJR будет ниже, чем Citations per document (2 years) – иногда в разы. Во многих научных организациях именно рейтинг, основанный на показателе SJR, используется при аттестации преподавателей и научных сотрудников.

При этом надо подчеркнуть, что в каждой области и категории знаний существуют свои рейтинги и квартили, которые могут быть никак не связаны с этими показателями в других областях науки. Скажем, в категории «Gerontology» SJR 0,84 позволяет журналу попасть в Q1, а вот в категории «Aging» для этого уже нужен SJR 1,6. Самый высокореიტинговый геронтологический журнал «Ageing Research Reviews» имеет показатель SJR 3,79, при этом его индекс Citations per document (2 years) на данный момент уже около 11. Однако ему очень далеко до самого «крутого» журнала «Ca-A Cancer Journal for Clinicians» с SJR 88,19 и Citations per document (2 years) около 255 (все цифры приведены для 2019 г.).

Погоня за формальными рейтингами и баллами заставляет ученых очень сильно торопиться при написании научных статей. У них просто не хватает времени на тщательную проверку рукописей на предмет грамматических и стилистических ошибок, а также на аккуратный статистический анализ полученных данных. Накладки с оценкой достоверности выявленных закономерностей встречаются в очень многих статьях, поступающих в наш журнал, причем рецензенты часто даже не

в состоянии проверить правильность проведенных расчетов, так как не имеют доступа к первичным данным, полученным в работе.

Отдельная проблема — пристатейные списки литературы. В идеале авторы должны проверять каждую использованную в работе ссылку — тем более что Интернет сейчас позволяет делать это достаточно быстро и эффективно. В одной из наших публикаций [10] мы предлагали использовать следующую схему такого процесса: 1) поиск статьи в соответствующих базах данных (PubMed, Google Scholar и т.п.); 2) проверка выходных данных на сайте издателя (Springer, Elsevier, Wiley, Taylor & Francis и др.); 3) проверка сокращенного названия журнала на сайте Web of Science (Journal Title Abbreviations) или с помощью ресурса CASSI (CAS Source Index); 4) приведение ссылки в соответствие с требованиями планируемого для публикации издания к формату цитирований. К сожалению, мой опыт работы в нескольких научных журналах свидетельствует о том, что практически 100% поступающих в редакцию рукописей содержат некорректные либо неправильно оформленные ссылки в списках литературы.

Впрочем, надо заметить, что в некоторых известных издательствах появилась практика публикации журнальных статей и глав в коллективных монографиях, дающая авторам возможность самостоятельно выбирать формат цитирования. Редакция сохраняет выбранный формат ссылок, не редактируя рукописи в этом плане. Скажем, не так давно мы опубликовали две главы в книге всемирно известного издательства Taylor & Francis [16, 17]. Эта коллективная монография содержит 35 глав, написанных различными авторами, и формат цитирования, а также списков литературы в разных главах различен. По-видимому, это обстоятельство, по мнению редакторов и издателей книги, не мешает адекватному восприятию материала читателями.

В любом случае, как мне кажется, использование в публикуемых работах «битых» ссылок не

только делает журналы претендентами на удаление из серьезных систем глобального цитирования, но и ставит под сомнение научную ценность приводимых в статьях концепций и экспериментальных данных.

В последнее время часто говорят, что проблемы с «кривыми» ссылками может решить использование DOI. Действительно, добавление DOI в списки литературы уменьшает вероятность появления ссылки, которую невозможно найти. Однако при большом количестве ссылок такой подход прилично увеличивает объем статьи. Кроме того, как свидетельствует мой опыт, довольно часто DOI тоже печатаются с ошибками и даже в окончательной версии публикации DOI может вести в никуда. По-видимому, иначе как тщательная работа авторов над пристатейными списками литературы ситуацию не исправит.

Таким образом, в борьбе между «неформальным» (ориентированным только на качество публикуемых статей) и «формальным» (учитывающим главным образом наукометрические показатели авторов и журналов) подходами к научным публикациям победу, как мне кажется, явно одерживает второй вариант. И причина этого, на мой взгляд, кроется преимущественно в выраженной коммерциализации процесса. Издательства заинтересованы в деньгах авторов (можно прикинуть, сколько зарабатывает только упомянутый выше журнал с 18000 статей в год, получая за каждую около 4000 долларов), а авторы — в наличии у них публикаций с высокими наукометрическими показателями, обеспечивающими гранты, должности, звания и победы в конкурсах. Не исключая, что это «правильная» стратегия, но я все же ностальгически вспоминаю те времена, когда царствовал «неформальный» подход к оценке научных достижений.

Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов. Финансирование работы отсутствовало.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khokhlov A.N. Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: thirty years after // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 4. P. 185–190.
2. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 2. P. 59–62.
3. Khokhlov A.N. The immortality of the germ line: the neverending story // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2019. Vol. 74. N 4. P. 189–193.
4. Kirpichnikov M.P., Khokhlov A.N. Moscow University Biological Sciences Bulletin — a new era of evolution (2007–2013) // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 3. P. 93–96.
5. Morgunova G.V., Khokhlov A.N., Kirpichnikov M.P. To the 70th anniversary of the journal Vestnik Moskovskogo

Universiteta. News from biologists // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 1. P. 1–3.

6. Kirpichnikov M.P., Morgunova G.V., Khokhlov A.N. Our journal—2020: what and how we publish // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 1. P. 1–6.

7. Хохлов А.Н., Моргунова Г.В. О некоторых альтернативных подходах к оценке эффективности научных журналов // Материалы 4-й Международной научно-практической конференции “Научное издание международного уровня — 2015: современные тенденции в мировой практике редактирования, издания и оценки научных публикаций”, 26–29 мая 2015 г. СПб.: Сев.-Зап. ин-т упр. — фил. РАНХиГС, 2015. С. 174–178.

8. Хохлов А.Н., Моргунова Г.В. К вопросу о проблемах издания переводных научных журналов // Материалы 5-й Международной научно-практической конфе-

ренции “Научное издание международного уровня – 2016: решение проблем издательской этики, рецензирования и подготовки публикаций”, 17–20 мая 2016 г. М.: РАНХиГС, 2016. С. 288–294.

9. Хохлов А.Н., Клебанов А.А., Моргунова Г.В. Каким образом очень плохие статьи публикуются в очень хороших научных журналах // Материалы 6-й Международной научно-практической конференции “Научное издание международного уровня – 2017: мировая практика подготовки и продвижения публикаций”, 18–21 апреля 2017 г. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. С. 150–156.

10. Хохлов А.Н., Клебанов А.А., Моргунова Г.В. Списки литературы в научных статьях: улучшить нельзя совсем отменить // Материалы 7-й Международной научно-практической конференции “Научное издание международного уровня – 2018: редакционная политика, открытый доступ, научные коммуникации”, 24–27 апреля 2018 г. М.: ООО «Ваше цифровое издательство», 2018. С. 152–157.

11. Хохлов А.Н. Чем хуже, тем лучше, или как по-быстрому создать высокорейтинговый научный журнал // Материалы 8-й Международной научно-практической конференции “Научное издание международного уровня – 2019: стратегия и тактика управления и развития”, 23–26 апреля 2019 г. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. С. 118–126.

12. Khokhlov A.N. Gerontology and scientometrics (“Citogerontology”) // *Bioinformatics of genome regulation*

and structure/systems biology (BGRS/SB-2020): The twelfth international multiconference (06–10 July 2020, Novosibirsk, Russia); Abstracts. Novosibirsk: ICG SB RAS, 2020. P. 648–649.

13. Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfranccone L., Pelicci P.G. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals // *Nature*. 1999. Vol. 402. N 6759. P. 309–313.

14. Beall J. Predatory publishers are corrupting open access // *Nature*. 2012. Vol. 489. N 7415. P. 179.

15. Beall J. Predatory publishing is just one of the consequences of gold open access // *Learn. Publ.* 2013. Vol. 26. N 2. P. 79–84.

16. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. Anti-aging drug discovery in experimental gerontological studies: from organism to cell and back // *Aging: exploring a complex phenomenon* / Ed. Sh.I. Ahmad. Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. P. 577–595.

17. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Autophagy – the way to death or immortality? Activators and inhibitors of autophagy as possible modulators of the aging process // *Aging: exploring a complex phenomenon* / Ed. Sh.I. Ahmad. Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. P. 475–485.

Поступила в редакцию 03.09.2020 г.

После доработки 21.09.2020 г.

Принята в печать 10.10.2020 г.

EDITORIAL

How scientometrics became the most important science for researchers of all specialties

A.N. Khokhlov 

*Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

The point of view of this article’s author, participating in the work of several scientific journals, on the current situation with the publication of articles by scientists of various specialties is presented. Two approaches to this problem are considered – “informal” (focused only on the quality of published manuscripts) and “formal” (taking into account mainly the scientometric indicators of both authors and journals). The continuous commercialization of this process is noted, associated with the emergence of a huge number of publications that require significant article processing charges from scientists to publish the results of their research. At the same time, the financial interests of publishers promote reducing the requirements for reviewing and editing articles submitted to the editorial board. It is emphasized the need for the appropriate formal scientometric indicators for researchers applying for grants, as well as for the corresponding positions and titles, which has arisen at the present stage. According to the author, excessive attention to such formal rankings does not improve the effectiveness of scientific publications, negatively affecting, in particular, the process of blind peer review, grammar and style of manuscripts, statistical processing of data given in articles, design of illustrations, as well as the quality of reference lists.

Keywords: *scientific publications, editorial policy, peer review, reference lists, scientometric indicators, article downloads, paid publications, scientists’ ranking*

Сведения об авторе

Хохлов Александр Николаевич – докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ, зам. главного редактора журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология»/«Moscow University Biological Sciences Bulletin». Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7454-7023>

ОБЗОР

УДК 595.7:57.012

Роль периферического окружения рецепторов нейронов в восприятии стимулов сенсорными органами насекомых: факты и гипотезы

С.Ю. Чайка 

*Кафедра энтомологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: biochaika@mail.ru*

На примере обонятельных, зрительных, механо-, гигро- и терморекцепторов рассмотрена роль промежуточных субстратов, представленных морфологическими структурами или химическими соединениями, находящимися между носителем информации (стимулом) и рецепторной мембраной дендрита в сенсорных органах насекомых. Промежуточные субстраты в обонятельных сенсиллах представлены их кутикулярными отделами, порами или поро-трубчатой системой, внутрисенсиллярной лимфой, а также одорант-связывающими белками. Промежуточными структурами являются также сочленовная мембрана (механорецепторные волоски), тимпанальная мембрана (органы слуха), минеральные статолиты (рецепторы гравитации), наночастицы оксида железа (рецепторы магнитного поля), окружающий дендриты матрикс (гигрорецепторы), связанные с мембраной дендрита микрочастицы (терморекцепторы), несклеротизированная мезокутикула (инфракрасные рецепторы). В распространении сигнала, воспринимаемого органами чувств большинства модальностей, наблюдается два этапа: 1) до контакта сигнала с периферическим окружением (веществом или структурой); 2) после контакта сигнала с периферическим окружением. При этом сигнал одной модальности на первом этапе своего распространения может замещаться сигналом иной модальности на втором этапе распространения, как, например, у гигро- или терморекцепторов, поскольку первичный стимул (влажность, тепло/холод, инфракрасное излучение) замещается механическим воздействием на мембрану дендрита его периферического окружения. Механизмы замещения модальности сигнала во многих сенсорных органах, равно как роль одорант-связывающих белков и поровых трубок в обонятельных сенсиллах окончательно не выяснены и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: *насекомые, сенсорные органы, обонятельные рецепторы, околорецепторные структуры, одорант-связывающие белки, поровые трубки, обзор*

Многообразие типов чувствительности насекомых обеспечивается наличием специализированных органов чувств, представленных у насекомых органами зрения и сенсиллами разной модальности.

Определение понятия сенсорной рецепции в монографиях, учебниках и энциклопедиях однозначно — это восприятие специализированными нервными клетками энергии различных раздражителей (химических, механических, термических, электромагнитных и др.) и преобразование ее в энергию нервных импульсов, т.е. в нервные сигналы. Последовательность функций рецепторов — восприятие и преобразование — также однозначна и не вызывает каких-либо сомнений. За исключением одного: из столь лаконичного определения рецепторного акта можно сделать вывод, что сенсорный мембранный рецептор всегда воспринимает нативный нетрансформированный первичный

стимул. Подобная трактовка подтверждается и определением механизма рецепции, включающего первичное взаимодействие рецептора с раздражителем. Однако результаты изучения рецепторов насекомых свидетельствуют о том, что такой механизм рецепции свойствен далеко не всем органам чувств. У насекомых наряду с рецепторами, воспринимающими нативные стимулы, имеются и рецепторы, воспринимающие преобразованные на своем пути к рецептору стимулы. Настоящий обзор направлен на обсуждение этой проблемы.

Обобщенное представление о первичном акте рецепции стимулов любой модальности было сформулировано в 70-е гг. прошлого века; в соответствии с ним в плазматической мембране дендритов рецепторных клеток имеются белковые молекулы, первыми вступающими в специфическое взаимодействие с дискретной единицей энергии внешнего стимула [1]. Впервые такие бел-

ковые обонятельные рецепторы у насекомых были идентифицированы в составе мембраны дендритов нейронов, расположенных в сенсиллах *Drosophila melanogaster* [2–4]. За последние двадцать лет получены многие данные, подтверждающие эту концепцию, применительно, по крайней мере, к наиболее хорошо изученным обонятельным рецепторам [5–7].

Сенсиллы насекомых представляют собой морфологически независимые элементарные сенсорные образования, состоящие из одной или нескольких специализированных первичночувствующих рецепторных клеток (нейронов), нескольких обкладочных клеток и кутикулярного отдела [8]. Первичночувствующие рецепторные клетки, в отличие от вторичночувствующих, не только воспринимают энергию стимула, но и сами генерируют и передают нервные импульсы в ганглии нервной системы. С помощью сенсилл насекомые воспринимают как ненаправленную на определенный организм информацию о состоянии внешней среды (ветрочувствительные рецепторы, гигро-, терморецепторы, рецепторы CO₂), так и направленную на определенные виды насекомых информацию в виде звуковых или световых сигналов, феромонов и других химических соединений.

Рецепторы насекомых классифицируют по разным параметрам: 1) модальности адекватных раздражителей (фоторецепторы, механорецепторы, хеморецепторы, терморецепторы, гигрорецепторы, рецепторы гравитации, магнитных и электрических полей); 2) отношению к организму исходящего сигнала (экстеро-, интеро- и проприоцепторы); 3) взаимному расположению рецептора и раздражителя (дистантное, контактное).

Однако строение экстероцепторов насекомых не позволяет большинству стимулов достичь рецепторной мембраны дендрита без предварительного взаимодействия с каким-либо субстратом, расположенным в периферическом окружении рецепторной мембраны, в некоторых случаях даже не относящемуся к нервной системе. Как известно, любое взаимодействие приводит к изменению обоих взаимодействующих объектов. Анализируя имеющуюся информацию по органам чувств насекомых [1, 8], нельзя не отметить недостаточную изученность функции субстратов, лежащих на пути движения стимула из внешней среды к рецепторной мембране дендритов рецепторных клеток, что затрудняет трактовку всех этапов акта первичной рецепции.

Наличие промежуточных субстратов, представленных морфологическими структурами или химическими соединениями, между носителем информации (стимулом) и воспринимающим рецептором в мембране нейрона свойственно органам чувств большинства модальностей. Наиболее сложная организация околорецепторного окружения свойственна обонятельным сенсиллам.

Восприятие химических стимулов

В последние три десятилетия произошел значительный прорыв в познании первичных механизмов восприятия насекомыми молекул химических соединений, прежде всего присутствующих в окружающей среде (одорантов), воспринимаемых обонятельными сенсиллами, и в меньшей степени – соединений, растворенных в различных пищевых жидкостях, которые воспринимаются контактными хеморецепторными (вкусовыми) сенсиллами.

Контактные хеморецепторные сенсиллы расположены не только на придатках ротового аппарата, но и на антеннах, лапках ног, гениталиях, яйцекладе, а у многих видов и на крыльях. Эти хемосенсорные органы представлены преимущественно трихонидными и базиконическими сенсиллами, для которых характерно наличие только одной или нескольких пор на вершине кутикулярного отдела и неветвящихся дендритов в последнем [8]. Дендриты в кутикулярном отделе находятся в сенсиллярной жидкости, являющейся единственным субстратом на пути между воспринимаемой пищевой жидкостью и вкусовыми рецепторами мембраны дендрита.

Изучая с помощью электрофизиологического метода реакции разных нейронов на вкусовые раздражители, во вкусовых сенсиллах выявлены 4 типа нейронов: сахарочувствительные (S) нейроны; водочувствительные (W) нейроны; нейроны, чувствительные к низким концентрациям солей (L1); нейроны, чувствительные к высоким концентрациям солей (L2) [9].

Рецепторы вкусовых соединений, расположенные на мембране дендритов контактных хеморецепторов, и кодирующие их гены впервые были идентифицированы у *Drosophila melanogaster* [10, 11], а одорант-связывающие белки выявлены у *Drosophila* [12] и серой мясной мухи *Boettcherisca peregrina* [13]. Однако пока неизвестна функция одорант-связывающих белков, выявляемых в тканях вкусовых органов насекомых, а также механизм формирования связи этих белков с лигандами.

Обонятельные органы насекомых более разнообразны по форме их кутикулярного отдела; среди них доминируют трихонидные, базиконические, целоконические, булавовидные, стилоконические и плакоидные сенсиллы. По строению кутикулярного отдела выделены одностенные сенсиллы, имеющие одну сплошную кутикулярную стенку, и двустенные сенсиллы, имеющие две связанные между собой стенки. Одностенные обонятельные сенсиллы характеризуются наличием многочисленных пор в кутикулярном отделе и ветвящихся дендритов в полости последнего. Кутикулярный отдел двустенных обонятельных сенсилл пронизан поровыми каналами, а в его полости расположены неветвящиеся дендриты рецепторных нейронов [8].

В мембране дендритов рецепторных клеток обонятельных сенсилл идентифицированы белки разных классов: рецепторы одорантов [5, 14, 15], ионотропные рецепторы [16], белки мембраны сенсорного нейрона [17]. В окружающей мембрану внутрисенсиллярной лимфе выявлены одорант-связывающие белки [18] и одорант-разлагающие ферменты [19].

Обонятельные рецепторы представлены длинными, пронизывающими мембрану белковыми молекулами, для которых характерно избирательное связывание с молекулами одорантов определенного класса; у мух рода *Drosophila* выявлено 52 типа обонятельных рецепторов [20]. При этом каждый обонятельный нейрон обладает только одним, редко двумя, типами таких рецепторов.

Установлено также, что восприятие молекулы одоранта рецепторным белком у *Drosophila* осуществляется при наличии в мембране дендрита белков-коррецепторов ORCO. В частности, белок OR83b (называемый также OR2 или OR7 у других насекомых) имеет сходное строение у разных нейронов, в отличие от рецепторных белков. Предполагается, что белок OR83b выполняет транспортную в отношении рецепторных белков функцию, поскольку при блокировании секреции этого белка рецепторные белки не связываются с мембраной дендрита [21]. В целокопических сенсиллах *Drosophila* выявлены ионотропные рецепторы, формирующие ионные каналы [16], которые рассматриваются как наиболее древние сенсорные рецепторы [22].

Возникает вопрос: как попадают молекулы одорантов на рецепторную мембрану? Ведь им надо проникнуть через многие околорецепторные структуры и лимфу, окружающую дендриты. В хеморецепторных органах насекомых такое периферическое окружение рецепторов представлено кутикулярными отделами сенсилл, их порами или поро-трубчатой системой и внутрисенсиллярной лимфой [23]. При этом сложилась парадоксальная ситуация, выражающаяся в том, что изученность и теоретическая обоснованность восприятия одоранта собственно мембранным рецептором оказались значительно глубже по сравнению с изученностью участия в этом процессе периферического окружения рецептора.

Первой структурой, на которую попадают молекулы одорантов, является пронизанный порами внешний слой кутикулы обонятельной сенсиллы. При этом судьба молекул, достигших этой поверхности, различна: теоретически, одни из молекул сразу попадают в поры, и можно предположить, что именно они служат источником информации о природе химического сигнала, в то время как большинство молекул попадает на внешнюю липопротеиновую пленку кутикулярного отдела сенсиллы. Попавшие на поверхность антенны одоранты разной природы, в том числе и феромоны,

подвергаются как ферментному разрушению [18, 24], так и механическому удалению при очистке (груминге) насекомыми антенн [25]. Получены также данные о неоднородности химического состава липидов поверхности обонятельных сенсилл у разных насекомых [26]. Допускалась также возможность «стекания» одорантов в поры по липопротеиновой пленке [23]. Однако молекулы одоранта, в частности полового феромона, не попавшие сразу в поры, вряд ли имеют сигнальное значение для насекомых, активно разыскивающих в полете полового партнера. Даже гипотетическое наличие такого «стекания», занимающего определенное время, значительно усложняет объяснение механизма ориентации насекомых на источник запаха, так как в этом случае насекомое будет воспринимать вещество, даже находясь вне запахового следа, что приведет к дезориентации его полета или поискового поведения [27].

Внутрисенсиллярными структурами, с которыми взаимодействуют молекулы одорантов, являются поровые трубки и одорант-связывающие белки.

Интенсивное изучение одорант-связывающих белков было обусловлено возможным решением проблемы доставки гидрофобных молекул одоранта через гидрофильную внутрисенсиллярную лимфу к рецепторной мембране дендрита. Появились работы, направленные на доказательство гипотезы активного переноса молекул одоранта к локусам мембраны рецепторной клетки [28]. По этой гипотезе молекулы одоранта, попав через поры в полость кутикулярного отдела сенсиллы, связываются с белковыми молекулами, которыми они активно транспортируются к мембране рецепторной клетки (рис. 1А). Первым фактом, подтвердившим перспективность развития данной гипотезы, было обнаружение в антенне бабочки *Antheraea polyphemus* белка, который связывался с молекулами феромона, но при этом не обладал инактивирующими свойствами в отношении этих молекул [18]. Установлено, что одорант-связывающие белки синтезируются обкладочными клетками сенсиллы и выделяются в сенсиллярную жидкость [24].

Благодаря использованию методов молекулярной биологии во внутрисенсиллярной жидкости обонятельных сенсилл многих насекомых (чешуекрылые, муха-дрозофила, комары, пчела медоносная) кроме одорант-связывающих белков выявлены и одорант-инактивирующие ферменты [19]. Предполагается, что эти ферменты инактивируют свободные молекулы одорантов, не связавшиеся с одорант-связывающими белками. Последние могут выполнять две функции: 1) транспортировку гидрофобных молекул одоранта через гидрофильную сенсиллярную жидкость к рецепторам на мембране дендрита; 2) защиту молекул одоранта от действия одорант-инактивирующих ферментов.

Процесс транспортировки молекул одорантов к рецепторной мембране сопровождается образованием комплекса, состоящего из определенного одорант-связывающего белка и лиганда — молекулы одоранта. Процесс взаимодействия этого комплекса с рецепторной мембраной детально не изучен и поэтому неизвестно, воспринимает ли мембранный рецептор весь комплекс, то есть одорант-связывающий белок и лиганд, или только один лиганд [7]. Восприятие рецептором всего комплекса может свидетельствовать о том, что одорант-связывающий белок, сформировав этот комплекс с определенным лигандом, определяет и специфичность комплекса в целом.

Кажущаяся логически безупречной и подтверждаемая экспериментальными данными концепция доставки молекул одорантов к рецепторам заметно пошатнулась при обнаружении одорант-связывающих белков во многих тканях и органах насекомых, не имеющих отношения к органам обоняния [29]. Одорант-связывающие белки к настоящему времени выявлены не только в обонятельных сенсиллах насекомых, но и во вкусовых сенсиллах, расположенных на лабеллумах хоботка и ногах [12, 13]. Кроме хеморецепторных органов одорант-связывающие белки обнаружены в гигро-рецепторных сенсиллах антенн *Drosophila* [20, 30]. Неожиданным было обнаружение этих белков в феромонных [31] и половых [32–34] железах, а также в кишечнике [35] насекомых.

Трудности однозначной трактовки роли одорант-связывающих белков обусловлены и рядом других фактов. Несмотря на широкое распространение в органах и тканях насекомых одорант-связывающих белков, многие из них, тем не менее, не обнаруживаются в нейронах обонятельных сенсилл, включая их аксоны и дендриты, но выявляются в обкладочных клетках сенсилл — текогенной, тормогенной. Для некоторых насекомых не удалось подтвердить участие одорант-связывающих белков в обонятельном процессе с помощью электрофизиологического метода [20]. Довольно неожиданными были и результаты изучения реакции рецепторных нейронов на одорант-связывающие белки. Показано, в частности, что одорант-связывающие белки могут в некоторых случаях не инициировать реакцию рецепторов в ответ на одорант, а, напротив, ее ингибировать [18].

Показано также, что реакция рецептора на одорант может проявляться и при отсутствии одорант-связывающих белков [36, 37]. Это подтверждается опытами с восприятием *D. melanogaster* феромона 11-цис-вакценилацетата, которое обычно обеспечивается наличием одорант-связывающего белка LUCH, трансмембранного белка SNMP и обонятельного рецептора OR67d [38, 39]. В электрофизиологических опытах с мутантными по белку LUCH дрозофилами установлено, что, несмотря на невозможность формирования у дро-

зофил комплекса «феромон—LUCH», последние обладали чувствительностью к феромону. Это косвенно указывает на возможность непосредственного активирования рецепторов нейронов молекулами феромона, хотя для этого требуется повышенная концентрация последнего.

Возникает вопрос: может ли периферическое окружение рецепторной мембраны в обонятельных сенсиллах выполнять более важную роль в механизмах первичной рецепции, чем проводниковая роль или его участие в деактивации молекул одорантов [40]? Такая возможность не исключается: в частности, сформулирована гипотеза, в соответствии с которой одорант-связывающие белки могут осуществлять селекцию запаховых молекул перед их доставкой к рецепторным белкам [7]. Если такое предположение подтвердится, то проблема первичных механизмов рецепции требует кардинального пересмотра, поскольку между молекулами одоранта и рецепторной мембраной нейрона существует промежуточное активное звено — соединения, «опознающие» природу обонятельного стимула и доставляющие последний к определенному рецептору мембраны дендрита.

Поровые трубки. Нет полной ясности и в трактовке функции поровых трубок в обонятельных сенсиллах. Экстраклеточные поровые трубки, формирующиеся в полости обонятельных волосков еще до вхождения в нее дендритов рецепторных клеток, имеют диаметр 15–20 нм, а их длина достигает в среднем 350 нм. Поровые трубки дистальным концом связаны с порами в кутикулярном отделе обонятельных сенсилл, а проксимальным концом контактируют с мембраной дендритов рецепторных клеток, формируя таким образом единую поро-трубчатую систему (рис. 1Б и 2А). Формирование пор в кутикуле обеспечивается специализированными выростами плазматической мембраны обкладочных клеток [41], а формирование поровых трубок происходит, по-видимому, путем самосборки липидного материала, выделяемого трихогенной клеткой. Поровые трубки обонятельных сенсилл сходны с поровыми каналами кутикулы (рис. 2Б), и это послужило основанием считать, что поровые трубки, как и поровые каналы, состоят из липидов, находящихся в мезоморфном состоянии, то есть имеют жидкокристаллическое строение [42]. Как отмечено выше, из сходного материала состоит и тонкий слой эпикутикулы, которому также, наряду с поро-трубчатой системой и сенсиллярной жидкостью, приписывают обеспечение «стекания» молекул одорантов, поступающих из внешней среды, в полость сенсорного волоска [23]. Поскольку поро-трубчатая система связывает рецепторную мембрану с внешней средой, то этим должна обеспечиваться высокая эффективность поступления молекул одоранта к рецепторной мембране.

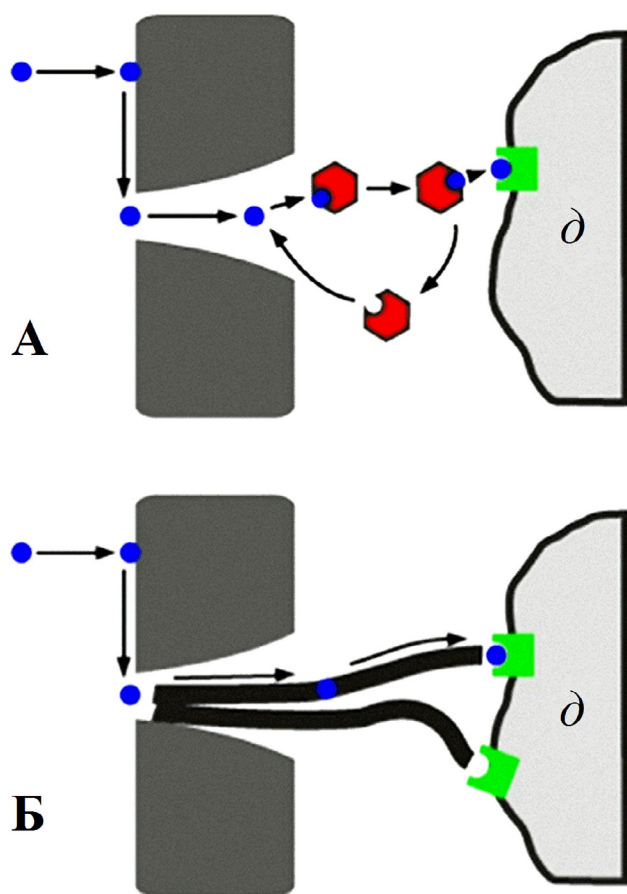


Рис. 1. Модели транспорта одорантов с помощью одорант-связывающих белков и поровых трубок.

А — молекулы одоранта (кружки), попав через пору в лимфу сенсиллы, связываются с одорант-связывающим белком (гексагон) и транспортируются к рецептору (квадрат) дендрита (δ); Б — транспорт молекул одоранта к рецептору дендрита по полости поровой трубки (по: Larter et al., 2016).

Липидный состав поровых трубок теоретически должен обеспечить диффузию липофильных молекул многих одорантов через липофобную внутрисенсиллярную лимфу полости сенсиллы, в которой находятся дендриты обонятельных нейронов. Жидкокристаллическим строением поровых трубок можно объяснить и механизм быстрого проникновения молекул одорантов к мембране рецептора, поскольку жидкие кристаллы характеризуются пластичностью, высокой адсорбционной активностью, легкой замещаемостью молекул [43]. Липидная жидкокристаллическая природа поровых трубок и внешнего слоя мембраны дендрита рецепторной клетки снимает проблему их связи друг с другом.

Поскольку проводниковая функция поровых трубок, долгое время рассматривавшаяся как основная для этих структур, выполняется по современным представлениям специальными белками, остается неясным вопрос о роли поровых трубок в контексте новой трактовки попадания молекул одоранта на рецепторную мембрану. Вследствие неясности, сложившейся вокруг роли поровых трубок в обонятельном процессе, последние часто просто упоминаются наряду с порами или вообще не отражены в схемах процесса рецепции либо, напротив, им вновь приписывается возможная роль в транспорте молекул одорантов к рецепторной мембране [20].

Пока не снят вопрос о том, каким образом попадают молекулы одоранта, находящиеся во внутрисенсиллярной жидкости, к рецепторной мембране дендритов в сенсиллах, у которых наблюдается контакт поровых трубок с рецепторной мембраной. Если молекулы одоранта попа-

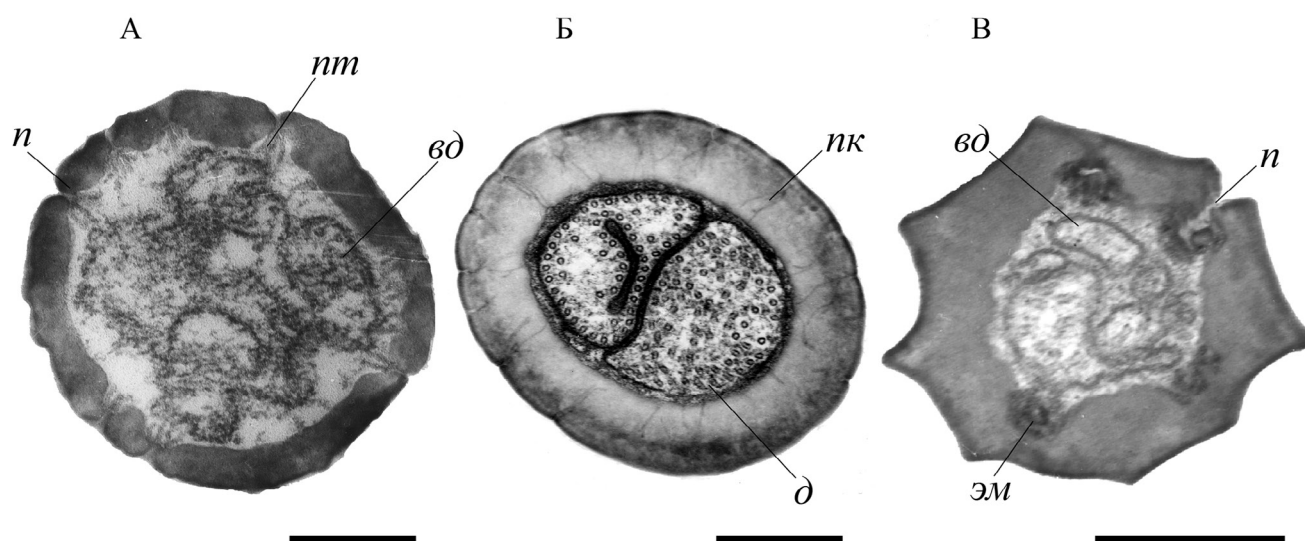


Рис. 2. Поперечные срезы через хеморецепторные сенсиллы антенн насекомых (фото автора, микроскоп JEM-1011 [JEOL, Япония]).

А — базиконическая сенсилла мошки *Boophthora erythrocephala* De Geer ($\times 40\,000$); Б — хеморецепторный волосок вши *Pediculus humanus corporis* De Geer ($\times 40\,000$); В — базиконическая сенсилла в обонятельной ямке блохи *Ceratophyllus sciurorum* Schrank ($\times 60\,000$). Обозначения: vd — ветви дендритов, d — дендриты, n — поры, nk — поровые каналы, nt — поровые трубки, $эм$ — электронноплотный материал. Масштабные линейки — 0,5 мкм.

дают в жидкость сенсиллы, каким-то образом минуя поровые трубки, то какую функцию несут последние? У некоторых насекомых поровые трубки расположены столь плотно, что практически полностью преграждают свободное сообщение поры с полостью кутикулярного отдела сенсиллы (рис. 2В). В наибольшей степени этот феномен выражен в обонятельных сенсиллах других членистоногих — клещей, в порах которых имеется электронно-плотная бляшка, а поровые трубки располагаются вокруг основания этой бляшки. Сходство материала поровых трубок и поровой бляшки, а также расположение последней, соответствующее расположению поровых трубок, дают основание рассматривать поровую бляшку как дополнительный уловитель молекул одорантов [44].

Имеется и иной взгляд на функцию поровых трубок. Исходя из жидкокристаллического состояния поровых трубок, автор настоящего обзора сформулировал гипотезу о том, что поровые трубки обонятельных сенсилл выполняют функцию проводника не самих молекул одорантов, а лишь информации о строении (химической природе) последних [27].

Известно, что попадание на жидкокристаллический холестерик даже небольшого количества какого-либо вещества меняет шаг спирали жидкого кристалла, что обнаруживается в опытах по изменению цвета отраженного света [45]. Это свойство жидких кристаллов обусловило их широкое применение в биологических сенсорах [46, 47]. В частности, на основе жидких кристаллов созданы датчики для разных аналитов — токсичных и взрывчатых веществ, возбуждителей болезней в выдыхаемом воздухе и др. [48].

При наличии контакта поровой трубки с мембраной рецепторной клетки последняя может мгновенно получить информацию о молекулах, адсорбированных порами обонятельных сенсилл. Это особенно важно для детектирования жизненно важных сигналов — например, молекул половых феромонов, концентрация которых в открытом пространстве обычно невысока.

Настоящая гипотеза предусматривает взаимодействие раздражителя с рецепторной мембраной нейрона, хотя такое взаимодействие осуществляется опосредованно — через поровые трубки. К тому же носитель информации и во многих других органах чувств достигает рецептора не в своем нативном состоянии, а в преобразованном. Рассмотрим взаимодействие раздражителей иных модальностей с рецепторами дендрита.

Восприятие стимулов разных модальностей

В фоторецепторах насекомых околорецепторные структуры представлены светопреломляющим аппаратом — роговичной линзой и кристаллическим конусом, а также пигментными и фоторецеп-

торными клетками, в цитоплазме которых имеются пигментные гранулы. В собственно фоторецепторную мембрану погружены белковая молекула родопсина и ретиналь (альдегид витамина А), и они ответственны за поглощение кванта света, энергия которого передается молекулам белка, что вызывает каскад ферментативных реакций, приводящих через усиление светового сигнала к запуску зрительного акта [49]. Поскольку фотоны представляют собой элементарные частицы с нулевой массой, но обладающие энергией, то только последняя выполняет триггерную роль в фоторецепторном акте. Вследствие этого промежуточные субстраты (если к последним мы не относим интегрированные в рецепторную мембрану родопсин и ретиналь) выполняют исключительно регулирующую функцию, воздействуя на световой поток на его пути к фоторецепторной мембране: фокусирование световых излучений в светочувствительную область фоторецепторов и экранирование световых потоков в разных отделах омматидия.

В органах чувств иных модальностей (гигро-, термо-, механорецепторах) промежуточные вещества или структуры, обеспечивающие специализацию сенсорного органа, также не входят в состав собственно рецептора мембраны. Они расположены на некотором расстоянии от рецепторной мембраны дендрита и эффективно улавливают энергию специфического раздражителя, передавая его мембране дендрита рецепторной клетки. В частности, в волосковых механорецепторах такая структура представлена сочленовной мембраной, передающей механические стимулы на мембрану трубчатого тела дендрита специализированного нейрона [8].

Специализация слуховых органов насекомых происходила путем установления связи хордотональных сенсилл с определенными структурами тела, обладающими способностью улавливать энергию звукоизлучения и передавать ее рецепторным клеткам [50]. В высокосоввершенных органах слуха — тимпанальных органах саранчовых, чешуекрылых, цикад и других насекомых — такой промежуточной структурой является тимпанальная мембрана, приходящая в колебания при действии звуковой волны и передающая эти сигналы рецепторным клеткам непосредственно или через примыкающие к ней воздушные камеры. По мнению Р.Д. Жантиева хордотональные сенсиллы, входящие в состав тимпанальных органов, не могли бы адекватно воспринять все параметры звуковых сигналов без вспомогательных структур [51].

Органы равновесия (гравитации) представлены у наземных насекомых разнообразными сенсиллами: волосковыми пластинками, булавоподобными сенсиллами, трохолитами, статолитоподобными органами, а у водных насекомых — статоцистами, смещение которых регистрируется нейронами механорецепторных волосков [8, 52].

Восприятие геомагнитного поля насекомыми осуществляется рецепторами, реагирующими на смещение магнетита — оксида железа, гранулы которого локализованы в эноцитах и клетках жирового тела [53].

По электрофизиологическим данным гигро-рецепторы представлены беспоровыми одностенными сенсиллами, а терморекцепторы — как беспоровыми одностенными, так и имеющими поры двустенными сенсиллами [54]. У многих насекомых функцию гигро- и терморекцепции выполняют сенсиллы одного типа, содержащие рецепторные клетки обеих модальностей [55].

В гигро-рецепторных сенсиллах имеется гидростатический материал, расположенный между кутикулой сенсиллы и дендритами рецепторных клеток. Насыщение этого материала парами влаги или их потеря при испарении оказывают механическое воздействие на рецепторы дендрита специализированного нейрона. Следовательно, изменения в гигроскопических компонентах, окружающих дендриты нейронов, индуцируют формирование электрического потенциала [54, 56].

В кутикулярном отделе терморекцепторов, представленных стилоконическими сенсиллами, дендрит терморекцепторной клетки имеет пластинчатое строение [57], и с его мембраной связаны примембранные сферические микрочастицы диаметром около 8 нм. Химический состав этих структур пока не выяснен, но предполагается, что они реагируют на изменение температуры изменением своих размеров, оказывая при этом разное давление на мембрану дендрита [58].

Органы, воспринимающие инфракрасное излучение, у жуков-златок *Melanophila* представлены иннервируемыми кутикулярными органами — сферами [59]. Они имеют кутикулярный отдел, состоящий из внешнего плотного слоя экзокутикулы и лежащего под ним слоя несклеротизированной губчатой мезокутикулы. Внутри сферулы имеется заполненная жидкостью полость, связанная с мезокутикулой системой микрополостей и тонких каналов, в которую входит дендрит механорецепторного нейрона. Изменения под действием инфракрасного излучения внутреннего давления жидкости в полости сферулы регистрируются механорецепторным нейроном. Следовательно, сенсиллы инфракрасных органов являются фотонными рецепторами, но иннервируются механорецепторными нейронами. Большое значение в акте рецепции инфракрасного излучения имеет периферическое окружение мембраны дендрита, поскольку кутикула и полости в сенсилле играют роль интерфейса между попадающим на кутикулу инфракрасным излучением и рецепторной мембраной механорецепторного нейрона [60]. Последний обладает высокой чувствительностью, которую связывают с наличием механизмов активного усиления входных сигналов [61].

Сравнительно недавно в ряде работ, выполненных на *Drosophila*, показано участие в терморекцепции сенсилл, нейроны которых обладают ионотропными рецепторами [62–64]. Однако механизм восприятия температурных стимулов ионотропными рецепторами остается неизученным.

Заключение

Нетрудно заметить, что во многих органах чувств насекомых, за исключением фото- и хеморецепторов, отсутствует непосредственное взаимодействие раздражителей многих модальностей с рецепторами дендрита, но влияние раздражителей на рецепторы осуществляется опосредованно — путем механического воздействия на них структур, окружающих дендриты рецепторных клеток.

Вследствие этого можно сделать вывод, что в распространении сигнала, воспринимаемого органами чувств многих модальностей, наблюдается два этапа: 1) до контакта сигнала с периферическим окружением (веществом или структурой); 2) после контакта сигнала с периферическим окружением. При этом сигнал на втором этапе распространения может замещаться сигналом иной модальности, как в случае гигро- и терморекцепторов, органов равновесия и геомагнитного поля, поскольку первичный стимул (влажность, тепло или холод, инфракрасное излучение, силы земного тяготения, магнитные поля) замещается механическим воздействием на мембрану дендрита его периферического окружения. К настоящему времени механизмы замещения модальности сигнала во многих сенсорных органах, равно как и роль одорант-связывающих белков и поровых трубок в обонятельных сенсиллах требуют дальнейшего изучения.

Автор не исключает и возможного пересмотра ряда концепций первичного восприятия стимулов рецепторами насекомых, поскольку одни из них воспринимают нативные стимулы, а другие — стимулы, преобразованные в механорецепторные. В последнем случае искомая модальность первичного сигнала воспринимается не мембранными рецепторами, а нейронами сенсорных органов и связанными с ними с помощью интернейронов нейронами специализированных центров головного мозга. Показано, например, что аксоны гигро- и терморекцепторных нейронов сенсилл, расположенных на антеннах таракана *Periplaneta americana*, следуют в специализированные гломерулы антеннальных долей, а затем с помощью интернейронов связываются с центрами латерального протоцеребрума головного мозга [65]. В центрах головного мозга (оптические доли, грибовидные тела, центральный комплекс и др.) осуществляется анализ, интеграция и кодирование всех сигналов, поступивших от рецепторов периферической нервной системы, что необходимо

для управления всеми жизненно важными функциями насекомого и обеспечения адекватности его поведенческих реакций.

Выражаю благодарность профессору Йельского университета (США) Джону Карлсону

(John R. Carlson) за любезно предоставленный рисунок.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ (фундаментальные научные исследования, АААА-А16-116021660101-5). Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vinnikov Y.A. Sensory reception: cytology, molecular mechanisms and evolution. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1974. 401 pp.
2. Clyne P.J., Warr C.G., Freeman M.R., Lessing D., Kim J., Carlson J.R. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila* // *Neuron*. 1999. Vol. 22. N 2. P. 327–338.
3. Gao Q., Chess A. Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence // *Genomic*. 1999. Vol. 60. N 1. P. 31–39.
4. Vosshall L.B., Amrein H., Morozov P.S., Rzhetsky A., Axel R. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna // *Cell*. 1999. Vol. 96. N 5. P. 725–736.
5. Leal W.S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes // *Annu. Rev. Entomol.* 2013. Vol. 58. P. 373–391.
6. Andersson M.N., Löfstedt C., Newcomb R.D. Insect olfaction and the evolution of receptor tuning // *Front. Ecol. Evol.* 2015. Vol. 3: 53.
7. Brito N.F., Moreira M.F., Melo A.C.A. A look inside odorant-binding protein in insect chemoreception // *J. Insect Physiol.* 2016. Vol. 95. P. 51–65.
8. Чайка С.Ю. Гистология насекомых: Учебное пособие. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2017. 520 с.
9. Hallem E.A., Dahanukar A., Carlson J.R. Insect odor and taste receptors // *Annu. Rev. Entomol.* 2006. Vol. 51. P. 113–135.
10. Clyne P., Warr C., Carlson J. Candidate taste receptors in *Drosophila* // *Science*. 2000. Vol. 287. N 5459. P. 1830–1834.
11. Dunipace L., Meister S., McNealy C., Amrein H. Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system // *Curr. Biol.* 2001. Vol. 11. N 11. P. 822–835.
12. Galindo K., Smith D.P. A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla // *Genetics*. 2001. Vol. 159. N 3. P. 1059–1072.
13. Koganezawa M., Shimada I. Novel odorant-binding proteins expressed in the taste tissue of the fly // *Chem. Senses*. 2002. Vol. 27. N 4. P. 319–332.
14. Buck L., Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition // *Cell*. 1991. Vol. 65. N 1. P. 175–187.
15. Fan J., Francis F., Liu Y., Chen J.L., Cheng D.F. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception // *Genet. Mol. Res.* 2011. Vol. 10. N 4. P. 3056–3069.
16. Benton R., Vannice K.S., Gomez-Diaz C., Vosshall L.B. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila* // *Cell*. 2009. Vol. 136. N 1. P. 149–162.
17. Rogers M.E., Sun M., Lerner M.R., Vogt R.G. Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 23. P. 14792–14799.
18. Vogt R.G., Riddiford L.M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae // *Nature*. 1981. Vol. 293. N 5828. P. 161–163.
19. Ishida Y., Leal W.S. Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105. N 26. P. 9076–9080.
20. Larter N.K., Sun J.S., Carlson J.R. Organization and function of *Drosophila* odorant binding proteins // *eLife*. 2016. Vol. 5: e20242.
21. Benton R., Sachse S., Stephen W., Milnick S.W., Vosshall L.B. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo // *PLoS Biol.* 2006. Vol. 4. N 2: e20.
22. Rimal S., Lee Y. The multidimensional ionotropic receptors of *Drosophila melanogaster* // *Insect Mol. Biol.* 2018. Vol. 27. N 1. P. 1–7.
23. Steinbrecht R.A. Pore structures in insect olfactory sensilla: a review of data and concepts // *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 1997. Vol. 26. N 3–4. P. 229–245.
24. Klein U. Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth *Antheraea polyphemus* (Saturniidae) // *Insect Biochem.* 1987. Vol. 17. N 8. P. 1193–1204.
25. Жуковская М.И. Одорантзависимые изменения поверхностных кутикулярных выделений на антенне таракана *Periplaneta americana* // *Сенсорные системы*. 2011. Т. 25. № 1. С. 78–86.
26. Maitani M.M., Allara D.L., Park K.C., Lee S.G., Baker T.C. Moth olfactory trichoid sensilla exhibit nanoscale-level heterogeneity in surface lipid properties // *Arthropod Struct. Dev.* 2010. Vol. 39. N 1. P. 1–16.
27. Chaika S.Yu. Insect olfaction: a hypothesis about the role of liquid-crystalline pore tubules in olfactory sensilla as conductors of information on the nature of signaling molecules // *Актуальные проблемы современной науки*. Т. 2. № 3 / Материалы трудов участников 12-й Международной телеконференции. Томск: Крокус, 2013. С. 3–6.
28. Leal W.S. Pheromone reception // *The Chemistry of pheromones and other semiochemicals II. Topics in current chemistry*, vol 240. / Ed. S. Schulz. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. P. 1–36.
29. Pelosi P., Iovinella I., Zhu J., Wang G.R., Dani F.R. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects // *Biol. Rev.* 2018. Vol. 93. N 1. P. 184–200.
30. Sun J.S., Larter N.K., Chahda J.S., Rioux D., Gumaste A., Carlson J.R. Humidity response depends on the small soluble proteins Obp59a in *Drosophila* // *eLife*. 2018. Vol. 7: e39249.
31. Jacquin-July E., Francois M.C., Nagnan-Le M.P. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromone gland of

- Mamestra brassicae* // Chem. Senses. 2001. Vol. 26. N 7. P. 833–844.
32. Li S., Picimbon J.F., Li S., Kan Y., Chuanling Q., Zhou J.J., Pelosi P. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. Vol. 372. N 3. P. 464–468.
33. Sun Y.L., Huang L.Q., Pelosi P., Wang C.Z. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species // PLoS One. 2012. Vol. 7: e30040.
34. Pitts J.R., Liu C., Zhou X., Malpartida J.C., Zwiebel L.J. Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2014. Vol. 111. N 7. P. 2566–2571.
35. Benoit J.B., Vigneron A., Broderick N.A., Aksoy S., Weiss B.L. Symbiont-induced odorant binding proteins mediate insect host hematopoiesis // eLife. 2017. Vol. 6: e19535.
36. Kiely A., Authier A., Ktalicek A.V., Warr C.G., Newcomb R.D. Functional analysis of a *Drosophila melanogaster* olfactory receptor expressed in Sf9 cells // J. Neurosci. Methods. 2007. Vol. 159. N 2. P. 189–194.
37. Ai M., Blais S., Park J.-Y., Min S., Neubert T.A., Suh G.S.B. Ionotropic glutamate receptors IR64a and IR8a form a functional odorant receptor complex *in vivo* in *Drosophila* // J. Neurosci. 2013. Vol. 33. N 26. P. 10741–10749.
38. Xu P.X., Atkinson R., Jones D.N.M., Smith D.P. *Drosophila* OBP LUSH report is required for activity of pheromone-sensitive neurons // Neuron. 2005. Vol. 45. N 2. P. 193–200.
39. Gomez-Diaz C., Reina J.H., Cambillau C., Benton R. Ligands for pheromone-sensing neurons are not conformationally activated odorant binding proteins // PLoS Biol. 2013. Vol. 11. N 4: e1001546.
40. Steinbrecht R.A. Stimulus transport and inactivation in insect olfactory sensilla: functional morphology, tracer experiments, and immunocytochemistry // Nervous systems — Principles of design and function / Ed. R.N. Singh. New Delhi: Wiley Eastern, 1992. P. 417–435.
41. Ando T., Sekine S., Inagaki S., Misaki K., Badel L., Moriya H., Sami M.M., Itakura Y., Chihara T., Kazama H., Yonemura S., Hayashi S. Nanopore formation in the cuticle of an insect olfactory sensillum // Curr. Biol. 2019. Vol. 29. N 9. P. 1512–1520.
42. Locke M. Permeability of insect cuticle to water and lipids // Science. 1965. Vol. 147. N 3655. P. 295–298.
43. Brown G.H., Wolken J.J. Liquid crystals and biological structures. N.Y.: Academic Press, 1979. 200 pp.
44. Леонович С.А. Сенсорные системы паразитических клещей. СПб.: Наука, 2005. 235 с.
45. Chandrasekhar S. Liquid crystals. 2nd edition. London, N.Y.: Cambridge Univ. Press, 1992. 460 pp.
46. Woltman S.J., Jay D.G., Crawford G.P. Liquid-crystal materials find a new order in biomedical applications // Nat. Mater. 2007. Vol. 6. N 12. P. 929–938.
47. Smalyukh I.I. Liquid crystals enable chemo-responsive reconfigurable colloidal self-assembly // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010. Vol. 107. N 9. P. 3945–3946.
48. Roling L.T., Scaranto J., Herron J.A., Yu H., Choi S., Abbott N.L., Mavrikakis M. Towards first-principles molecular design of liquid crystal-based chemoresponsive systems // Nature Commun. 2016. Vol. 7: 13338.
49. Ostrovsky M.A. Molecular physiology of visual pigment rhodopsin // Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2012. Vol. 6. N 2. P. 128–138.
50. Понов А.В. Акустическое поведение и слух насекомых. Л.: Наука, 1985. 256 с.
51. Жантеев Р.Д. Биоакустика насекомых. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. 256 с.
52. Ishay J.S., Shimony T.(B.). Arcan L. The presence of statocysts and statoliths in social wasps (Hymenoptera, Vespinae) // Life Sci. 1983. Vol. 32. N 15. P. 1711–1719.
53. Hsu C.Y., Li C.W. Magnetoreception in honeybees // Science. 1994. Vol. 265. N 5. P. 95–97.
54. Altner H., Loftus R. Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors // Annu. Rev. Entomol. 1985. Vol. 30. P. 273–295.
55. Steinbrecht R.A., Müller B. The thermo-/hygrosensitive sensilla of the silkworm, *Bombyx mori*: morphological changes after dry- and moist-adaptation // Cell Tissue Res. 1991. Vol. 266. N 3. P. 441–456.
56. Yokohari F. Hygroreceptor mechanism in the antenna of the cockroach *Periplaneta* // J. Comp. Physiol. 1978. Vol. 124. P. 53–60.
57. Altner H., Tichy H., Altner I. Lamellated outer dendritic segments of a sensory cell within a poreless thermo- and hygroreceptive sensillum of the insect *Carausius morosus* // Cell Tissue Res. 1978. Vol. 191. N 2. P. 287–304.
58. Steinbrecht R.A. Receptor membrane substructure and sensory cell contacts // Cell Tissue Res. 1989. Vol. 255. N 1. P. 49–57.
59. Vondran T., Apel K.-H., Schmitz H. The infrared receptor of *Melanophila acuminata* De Geer (Coleoptera: Buprestidae): Ultrastructural study of a unique insect thermoreceptor and its possible descent from a hair mechanoreceptor // Tissue Cell. 1995. Vol. 27. N 6. P. 645–658.
60. Schmitz A., Schmitz H. Cuticle as functional interface in insect infrared receptors // Functional surface in biology. III. Biologically-inspired systems, vol. 10 / Eds. S.N. Gorb and E.V. Gorb. Berlin: Springer, 2018. P. 3–25.
61. Schneider E.S., Schmitz A., Schmitz H. Concept of an active amplification mechanism in the infrared organ of pyrophilous *Melanophila* beetles // Front. Physiol. 2015. Vol. 6: 391.
62. Chen C., Buhl E., Xu M., Croset V., Rees J.S., Lilley K.S., Benton R., Hodge J.J., Stanewsky R. *Drosophila* ionotropic receptor 25a mediates circadian clock resetting by temperature // Nature. 2015. Vol. 527. N 7579. P. 516–520.
63. Knecht Z.A., Silbering A.F., Ni L., Klein M., Budelli G., Bell R., Abuin L., Ferrer A.J., Samuel A.D., Benton R., Garrity P.A. Distinct combinations of variant ionotropic glutamate receptors mediate thermosensation and hygroreception in *Drosophila* // eLife. 2016. Vol. 5: e17879.
64. Ni L., Klein M., Svec K.V., Budelli G., Chang E.C., Ferrer A.J., Benton R., Samuel A.D.T., Garrity P.A. The ionotropic receptors IR21a and IR 25a mediate cool sensing in *Drosophila* // eLife. 2016. Vol. 5: e13254.
65. Nishino H., Yamashita S., Yamazaki Y., Nishikawa M., Yokohari P., Mizunami M. Projection neurons originating from thermo- and hygrosensory glomeruli in the antennal lobe of the cockroach // J. Comp. Neurology. 2003. Vol. 455. N 1. P. 40–55.

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 21.08.2020 г.

Принята в печать 02.09.2020 г.

REVIEW

The role of peripheral environment of neuronal receptors in the perception of stimuli by sensory organs of insects: facts and hypotheses

S.Yu. Chaika 

*Department of Entomology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: biochaika@mail.ru*

The role of intermediate substrates represented by morphological structures or chemical compounds, located between the information carrier (stimulus) and the dendrite receptors of insect sensory organs is considered on example of olfactory, visual, mechanical, hygro-, and thermoreceptors. Intermediate substrates in olfactory sensillae are represented by their cuticular regions, pores or pore-tubular system, sensillum lymph, and odorant-binding proteins. Intermediate structures also imply articular membrane (mechanoreceptor hairs), tympanic membrane (hearing organs), mineral statoliths (gravity receptors), iron oxide nanoparticles (magnetic field receptors), matrix surrounding the dendrites (hygroreceptors), microparticles associated with the dendrite membrane (thermoreceptors), and non-sclerotized mesocuticle (infrared receptors). There are two stages in propagation of a signal that is perceived by sense organs of most modalities: 1) before signal contacts the peripheral environment (substance or structure); 2) after signal contacts the peripheral environment. Besides, a signal of one modality on the first stage of its propagation can be replaced by a signal of other modality at the second stage of propagation, as, for example, in hygro- or thermoreceptors, since the primary stimulus (moisture, heat/cold, infrared radiation) is replaced by a mechanical effect on the dendrite membrane of its peripheral environment. The mechanisms of signal modality substitution in many sense organs, as well as the role of odorant-binding proteins and pore tubes in olfactory sensillae have not been fully elucidated and require further study.

Keywords: *insects, sense organs, olfactory receptors, perireceptor compartments, odorant-binding proteins, pore tubules, review*

Сведения об авторе

Чайка Станислав Юрьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры энтомологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-16-95; e-mail: biochaika@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1298-3724>

ОБЗОР

УДК 571.27

Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты

Н.В. Воробьева 

*Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Нейтрофилы являются «первой линией» защиты от патогенов в очаге воспаления, где они используют такие эффекторные функции, как фагоцитоз, дегрануляцию и образование активных форм кислорода (АФК). В 2004 г. Артуро Циклински охарактеризовал еще одну эффекторную функцию нейтрофилов – выброс нейтрофильных внеклеточных ловушек, или NET (neutrophil extracellular traps). NET представляют собой модифицированный хроматин, «декорированный» бактерицидными белками гранул, ядра и цитоплазмы. Выброс NET может активироваться разнообразными физиологическими и фармакологическими стимулами и зависит от АФК, основным источником которых является NADPH-оксидаза. В процессе активации NET происходят выход бактерицидных компонентов гранул в цитоплазму, модификация гистонов, ведущая к деконденсации хроматина, разрушение ядерной оболочки и цитоплазматической мембраны при участии белка газдермина D и, наконец, выброс хроматина за пределы клетки. Вместе с тем, неконтролируемое образование NET является провоцирующим фактором развития многих воспалительных и аутоиммунных заболеваний. NET были обнаружены при таких аутоиммунных заболеваниях, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, псориаз и васкулиты; NET участвуют в патогенезе сердечно-сосудистых, легочных и онкологических заболеваний. В настоящем обзоре обсуждаются основные представления о механизмах образования NET, а также их роль в физиологических процессах и патогенезе ряда заболеваний, включая COVID-19.

Ключевые слова: *нейтрофил, нейтрофильные внеклеточные ловушки, NETоз, NADPH-оксидаза, активные формы кислорода, тромбообразование, сепсис*

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение.....	210
2. Механизмы образования NET	211
2.1. NETоз, происходящий с участием NADPH-оксидазы	211
2.2. NETоз, происходящий с участием митохондриальных АФК.....	214
2.3. Роль гистонов в образовании NET	214
2.4. Витальный выброс хроматина	214
3. Роль NET в защите хозяина и в патологии.....	215
3.1. NET и воспалительные заболевания легких	215
3.2. NET и тромбообразование	216
3.3. NET и рак.....	216
3.4. NET и аутоиммунные заболевания.....	217
3.5. Сепсис.....	217
Заключение.....	217
Список литературы	221

Введение

С момента расшифровки генетического кода в середине 60-х гг. прошлого века и до 2004 г. считалось, что ДНК служит исключительно для хранения генетической информации. Однако оказалось, что хроматин является также частью врожденного иммунитета и выполняет важные эффекторные функции в отношении большого

количества разнообразных патогенов. Это открытие принадлежит группе ученых, работающих под руководством Артуро Циклински и опубликовавших свою «революционную» работу в журнале Science в 2004 г. [1]. Выброс хроматина впервые наблюдали у нейтрофилов человека и мышей, и он получил название нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps,

NET). NET состоят из модифицированного хроматина, «декорированного» белками гранул, ядра и цитоплазмы. Поскольку первоначально было показано, что образование NET сопровождается гибелью нейтрофилов, этот процесс был назван НЕТозом [2], и он отличается по ряду признаков от апоптоза, некроза, некроптоза и аутофагии.

Образование NET может активироваться большим количеством разнообразных физиологических стимулов, таких как бактерии, грибы, простейшие, вирусы, компоненты бактериальной клеточной стенки – липополисахариды (ЛПС). Выброс NET могут индуцировать антитела и иммунные комплексы, цитокины и хемокины (IL-8, TNF- α , IFN- γ), холестерин, стеариламин, микрокристаллы, а также такие фармакологические стимулы, как форбол 12-миристинат 13-ацетат (ФМА), кальциевые (иономицин, A23187) и калиевые (нигерицин) ионофоры [3].

Выброс хроматина был обнаружен и у других типов гранулоцитов – эозинофилов [4], базофилов [5], тучных клеток [6], а также у лимфоцитов (Т-лимфоциты, В-лимфоциты, натуральные киллерные клетки) [7], моноцитов [8] и макрофагов [9]. Интересно, что деконденсированный хроматин используют для защиты от патогенов не только животные, но и низшие эукариоты – например, почвенная амеба *Dictyostelium discoideum* [10], а также растения. Так, в работе Хоза и соавт. [11] был обнаружен выброс хроматина корнями растений в ответ на патогенные грибы.

Помимо участия в защите хозяина от патогенов, NET играют существенную роль в патогенезе многих воспалительных и аутоиммунных заболеваний. NET были обнаружены при тяжелых легочных, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях. Компоненты NET являются триггерами для образования аутоантител, и NET-опосредованные иммунные комплексы были обнаружены при таких аутоиммунных патологиях, как системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит (РА), псориаз, васкулиты и др. В связи с этим, понимание сигнальных путей, лежащих в основе образования NET, крайне важно при создании лекарственных средств для борьбы с перечисленными недугами. В настоящее время накоплено достаточно много данных о механизмах образования NET, но их понимание является далеко не полным. В данном обзоре рассмотрены базовые представления о механизмах образования нейтрофильных ловушек, а также освещена их роль в патогенезе ряда заболеваний.

2. Механизмы образования NET

2.1. НЕТоз, происходящий с участием NADPH-оксидазы

НЕТоз, происходящий с участием NADPH-оксидазы и заканчивающийся гибелью нейтрофи-

ла, был исследован в первых работах А. Циклински и условно назван классическим или суицидальным [1]. Агонистами классического НЕТоза являются многие микроорганизмы и фармакологические стимулы, включая ФМА. Механизм этого типа НЕТоза в настоящее время подробно изучен (рис. 1 и 2). ФМА, имитируя действие диацилглицерола, активирует изоформы протеинкиназы C (ПКC), участвующие в фосфорилировании субъединиц NADPH-оксидазы [12]. Последующая сборка и активация NADPH-оксидазы приводят к превращению молекулярного кислорода в супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$). Фармакологическое ингибирование NADPH-оксидазы или нейтрализация АФК подавляют образование NET [13]. Важно отметить, что нейтрофилы пациентов с мутациями в субъединицах NADPH-оксидазы не способны к образованию NET в ответ на фармакологические стимулы и микроорганизмы, что подтверждает важную роль АФК на генетическом уровне [14]. Супероксидный анион-радикал дисмутирует спонтанно или при участии супероксиддисмутазы с образованием пероксида водорода, который затем превращается в галоидные кислоты при участии миелопероксидазы (МПО). Было показано, что ингибиторы МПО также блокируют НЕТоз, и нейтрофилы пациентов с мутациями этого фермента не образуют NET [15].

МПО является частью белкового комплекса, называемого «азуромой» и расположенного в азурофильных гранулах. Азуросома включает восемь типов белков, таких как МПО, нейтрофильная эластаза (НЭ), азуроцидин, катепсин G, лактоферрин, протеиназа 3, лизоцим и эозинофильный катионный белок, причем три из них представляют собой высокомолекулярные сериновые протеазы (НЭ, катепсин G и азуроцидин) [16]. Показано, что пероксид водорода вызывает диссоциацию азуромы, что способствует выходу сериновых протеаз из гранул в цитозоль [16]. В цитозоле НЭ расщепляет F-актин, что приводит к диссоциации цитоскелета и иммобилизации нейтрофила [16]. Затем сериновые протеазы мигрируют из цитозоля в ядро, по-видимому, пассивно диффундируя через ядерные поры. В ядре НЭ расщепляет гистоны, способствуя деконденсации хроматина. МПО также перемещается в ядро, где действует синергетически с НЭ, хотя точная функция этого фермента в НЕТозе не известна. Из цитоплазмы в ядро также поступает пептидил-аргининдезаминаза 4 (PAD4) [17], которая обеспечивает цитруллинирование гистонов (дезаминирование положительно заряженных остатков аргининов с образованием электронейтральных цитруллинов), что приводит к ослаблению связи гистонов с хроматином и его последующей деконденсации. После разрушения ядерной и гранулярных мембран при участии порообразующего белка

газдермина D (GSDMD) [18] происходит электростатическое связывание содержимого гранул с деконденсированным хроматином. На завершающей стадии процесса в цитоплазматической мембране образуются поры, также сформированные газдермином D [18], через которые хроматин

выбрасывается во внеклеточное пространство — происходит НЕТоз [19].

Было показано, что в процессе классического сигнального пути индуцируются такие киназы, как c-Raf, MEK, Akt и ERK, также участвующие в активации NADPH-оксидазы [13].

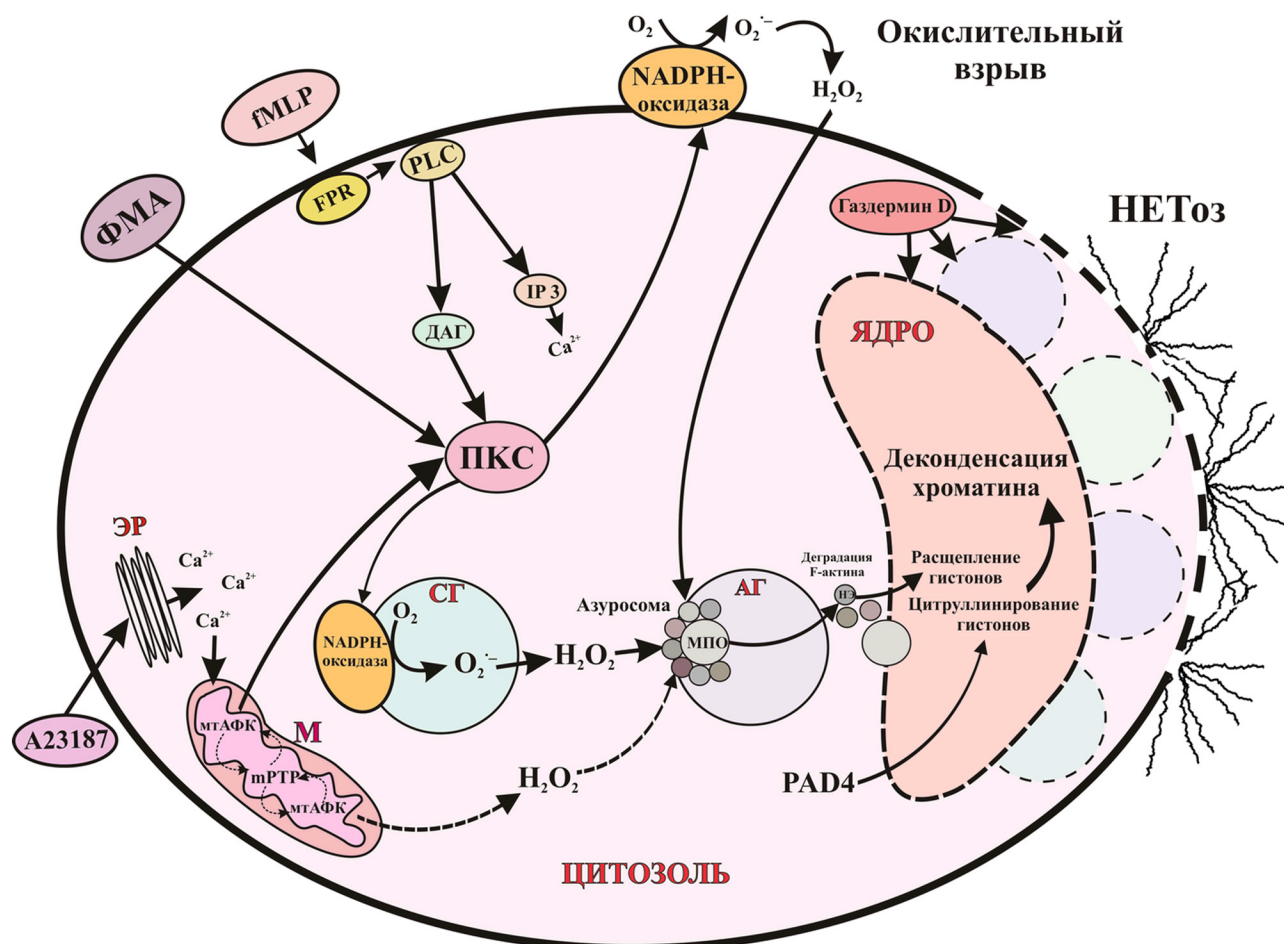


Рис. 1. Схематическое изображение классического НЕТоза

Стимулятор классического НЕТоза форбол 12-миристинат 13-ацетат (ФМА), участвующие в фосфорилировании субъединиц NADPH-оксидазы. Последующая сборка и активация NADPH-оксидазы на мембранах специфических гранул (СГ) и на цитоплазматической мембране приводят к превращению молекулярного кислорода в супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot -}$). Затем супероксид дисмутирует спонтанно или при участии супероксиддисмутазы с образованием пероксида водорода (H_2O_2). NADPH-оксидаза может быть также активирована хемоаттрактантом *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (fMLP), который, связываясь со специфическим рецептором, активирует фосфолипазу С (PLC), стимулирующую образование диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата (IP3) из фосфатидилинозитолдифосфата. По невыясненным до сих пор причинам, fMLP не индуцирует НЕТоз. Пероксид водорода стимулирует диссоциацию «азуросом», расположенных в мембранах азурофильных гранул (АГ) и состоящих из 8 типов белков, включая миелопероксидазу (МПО) и сериновые протеазы — нейтрофильную эластазу (НЭ), катепсин G и азуроцидин. Сериновые протеазы выходят в цитозоль и расщепляют F-актин, способствуя диссоциации актинового цитоскелета и иммобилизации нейтрофила. Затем сериновые протеазы мигрируют из цитозоля в ядро, где они (в основном, НЭ) расщепляют гистоны, способствуя деконденсации хроматина. МПО также перемещается в ядро, где действует синергетически с НЭ. Из цитоплазмы в ядро также поступает пептидил-аргининдезаминаза 4 (PAD4), которая обеспечивает цитруллинирование гистонов, что приводит к ослаблению связи гистонов с хроматином и его последующей деконденсации. Параллельно происходит везикуляция ядерной мембраны и разрушение мембран гранул при участии порообразующего белка газдермина D, что приводит к последующему электростатическому связыванию содержимого гранул с деконденсированным хроматином. На завершающей стадии процесса в цитоплазматической мембране образуются поры, также сформированные газдермином D, через которые хроматин выбрасывается во внеклеточное пространство — происходит НЕТоз. НЕТоз, вызванный кальциевым ионофором A23187, начинается с мобилизации Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭР). Последующее накопление Ca^{2+} в митохондриальном матриксе (М) приводит к активации неселективной митохондриальной поры (mPTP) и образованию митохондриальных активных форм кислорода (мтАФК). мтАФК затем выходят из митохондрий в цитозоль, где активируют NADPH-оксидазу, по-видимому, при участии протеинкиназы С (PKC) [16, 18, 31].

Пунктирные стрелки указывают на гипотетический путь передачи информации.

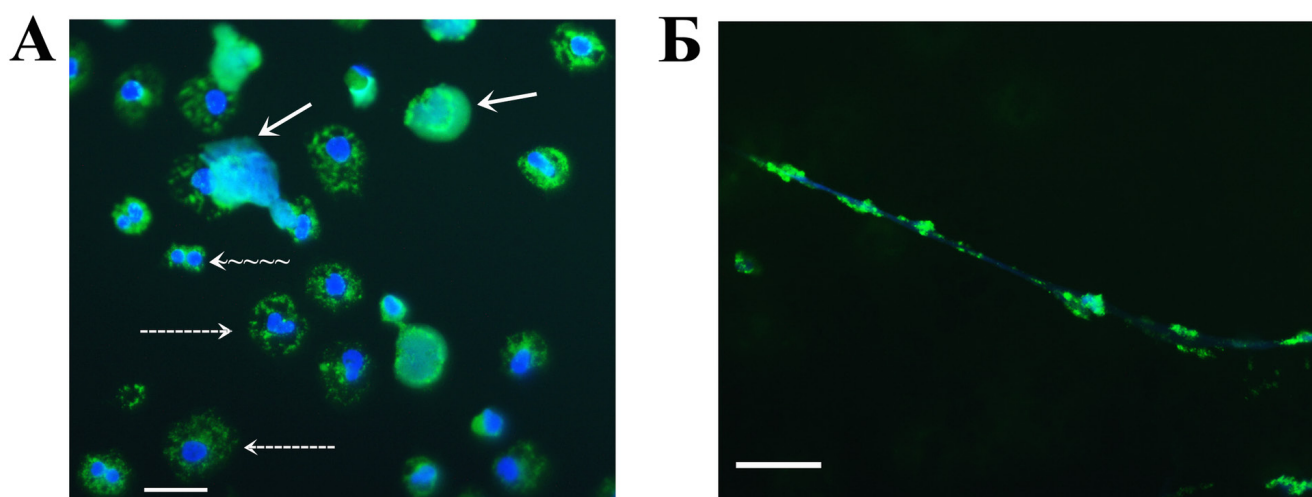


Рис. 2. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET). Иммунофлуоресцентное окрашивание

На фотографии (А) можно видеть различные стадии образования NET после стимуляции нейтрофилов человека ФМА. Сплошные стрелки указывают на нетотические нейтрофилы, пунктирные — на активированные клетки с делобулированным ядром, волнистые — на интактные нейтрофилы.

Хроматин окрашен DAPI (голубое свечение), миелопероксидаза — FITC-мечеными антителами к МПО (зеленое свечение). Увеличение: 40×. Масштаб 25 μm.

На фотографии (Б) представлена нейтрофильная ловушка, полученная при стимуляции нейтрофилов ФМА. Остов ДНК окрашен DAPI (голубое свечение), катионный антимикробный белок кателицидин hCAP18 — FITC-мечеными антителами к LL-37 (зеленое свечение). Увеличение 100×. Масштаб 5 μm.

Фотографии получены Н.В. Воробьевой.

Следует отметить, что данные, касающиеся участия PAD4 в ФМА-индуцированном НЕТозе, являются противоречивыми. С одной стороны, было показано, что нейтрофилы мышей, имеющие нокаут по PAD4, не формируют NET в ответ на ФМА. Кроме того, фармакологическое подавление PAD4 хлорамидином GSK484 также приводило к ингибированию НЕТоза, индуцированного форболовым эфиром [20]. С другой стороны, с использованием конфокальной микроскопии было установлено, что ФМА не вызывает существенного дезаминарования гистонов при НЕТозе [21], основной функции PAD4.

Возможное участие PAD4 в классическом НЕТозе, индуцированном ФМА, вызывает другой интересный вопрос. Поскольку PAD4 является кальций-зависимым ферментом, то при активации НЕТоза ФМА необходимо повышение цитозольного Ca^{2+} . Однако, как было показано в ранних работах, ФМА не стимулирует высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула [22] или приток внеклеточного Ca^{2+} в цитозоль [23]. В связи с этим участие PAD4 в ФМА-индуцированном НЕТозе становится маловероятным. Вместе с тем, в нашей работе [24] было установлено, что ФМА-индуцированный НЕТоз подавляется эффективно и дозозависимым способом хелатором цитозольного Ca^{2+} ВАРТА-АМ, что свидетельствует о скрытом повышении содержания цитозольного Ca^{2+} , которого хватает для активации PAD4 и индукции НЕТоза.

Активация специфических рецепторов может не только стимулировать, но и подавлять НЕТоз. Например, простагландин E_2 ингибировал НЕТоз благодаря стимуляции соответствующих рецепторов (EP_2 и EP_4), связанных с G-белком, приводя к увеличению содержания внутриклеточного циклического АМФ и, далее, к подавлению ПКС и последующих стадий образования NET [25]. Кроме того, активированный С-белок (сериновая протеиназа, обладающая противосвертывающим и противовоспалительным действием) также ингибировал НЕТоз благодаря связыванию со специфическим рецептором (EPCR) или кооперативному взаимодействию с протеаза-активируемым рецептором 3 (PAR3) и интегринами CD11b/CD18 (Mac-1) [26]. Эти факты свидетельствуют о том, что НЕТоз может регулироваться как про-, так и противовоспалительными медиаторами.

Недавно было показано, что NADPH-оксидаза-зависимый НЕТоз происходит при активации циклин-зависимых киназ (cyclin-dependent kinases, CDK), которые способствуют переходу нейтрофилов из стадии G_0 обратно в клеточный цикл [27]. Поскольку нейтрофилы являются терминально дифференцированными клетками, участие белков клеточного цикла в НЕТозе является удивительным фактом. В нейтрофилах, индуцированных к НЕТозу, были обнаружены такие события клеточного цикла, как экспрессия маркера пролиферации — ядерного антигена Ki-67, фосфорилирование белка ретинобластомы и ядерных ла-

минов, а также разделение centrosомы, однако репликации ДНК и транскрипции гистоновых генов при этом не происходило [27]. Вышеописанные факты говорят о том, что нейтрофилы используют часть аппарата клеточного цикла для разрушения ядерной мембраны в процессе НЕТоза.

2.2. НЕТоз, происходящий с участием митохондриальных АФК

Ранее было показано, что кальциевые ионофоры A23187 и иономицин, а также калиевый ионофор нигерицин стимулируют НЕТоз, происходящий без участия NADPH-оксидазы [28, 29]. Однако оказалось, что АФК все же нужны для этой формы НЕТоза и их источником могут быть митохондриальные АФК (мтАФК) [30] или АФК, выделяемые самим патогеном [28].

В недавно проведенной нами работе [31] с использованием митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 и специфических ингибиторов NADPH-оксидазы было показано, что в НЕТозе, индуцированном A23187, принимают участие как митохондрии и мтАФК, так и NADPH-оксидаза, и между ними происходит перекрестное взаимодействие. Кроме того, с использованием ингибиторного анализа было показано, что образование мтАФК обусловлено обратимым открытием митохондриальной поры, mPTP [31] (рис. 1).

Вместе с тем, нейтрофилы, выделенные из крови пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) и имеющие нефункциональную NADPH-оксидазу (Х-сцепленная ХГБ), образовывали NET в ответ на A23187 без участия оксидазы [31]. Мы предполагаем, что у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов мтАФК образуются с повышенной интенсивностью и их количества хватает для активации НЕТоза [31]. Такое повышенное образование мтАФК, вероятно, связано с отсутствием электрогенной функции фермента, которая в норме обеспечивает деполяризацию мембраны [32] и благодаря этому останавливает неконтролируемое поступление внеклеточного Ca^{2+} в цитозоль. Повышенная концентрация цитозольного Ca^{2+} была недавно продемонстрирована нами у нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с ХГБ при активации НЕТоза с помощью A23187 [24]. По-видимому, избыточный приток Ca^{2+} в митохондрии вызывает aberrантно высокое образование мтАФК с участием mPTP [33], что стимулирует НЕТоз при активации A23187, но вместе с тем может быть причиной многих воспалительных и аутоиммунных заболеваний у таких пациентов.

Таким образом, по нашему мнению, НЕТоз, индуцированный кальциевыми ионофорами и часто называемый «NADPH-оксидаза-независимым», правильнее именовать «митохондриально-зависимым НЕТозом».

2.3. Роль гистонов в образовании NET

Гистоны представляют собой небольшие белки, принимающие участие в структурной организации хроматина, нейтрализуя за счет положительных зарядов аминокислотных остатков отрицательно заряженные фосфатные группы ДНК, что делает возможной плотную упаковку ДНК в ядре. Гистоны обладают как мощным противомикробным, так и токсическим действием в отношении животных клеток. Цитотоксичность гистонов в настоящее время хорошо изучена, и было показано, что антигистоновые антитела предотвращают патогенез различных заболеваний в мышинных моделях [34]. В процессе образования NET в ткани выбрасывается огромное количество гистонов, которые, с одной стороны, токсичны для патогенов, а с другой — вызывают повреждение тканей. По-видимому, антимикробная функция NET (по крайней мере, частично) обусловлена действием гистонов.

Установлено, что посттрансляционная модификация гистонов регулирует не только генную экспрессию, но и структуру хроматина [35]. Одной из таких модификаций, происходящих во время НЕТоза, является их необратимое расщепление сериновыми протеазами, что способствует деконденсации хроматина. В процессе НЕТоза гистоны также могут подвергаться цитруллинированию при участии пептидил-аргининдезаминаз (PAD) [20, 36]. Вместе с тем, данные, касающиеся участия PAD4 в НЕТозе, являются противоречивыми, и этот вопрос требует более тщательного исследования. Было установлено, что ацетилирование гистонов также способствует образованию NET [37], видимо, благодаря нейтрализации положительно заряженных групп гистонов.

2.4. Витальный выброс хроматина

Альтернативной формой суицидального НЕТоза является прижизненный, или витальный выброс внеклеточного хроматина, при котором клетки сохраняют свою жизнеспособность и естественные эффекторные функции. Было обнаружено, что этот процесс развивается значительно быстрее суицидального НЕТоза и может происходить с выбросом как ядерной, так и митохондриальной ДНК.

В модели, разработанной Кларком и соавт. [38], был описан витальный выброс хроматина, индуцированный компонентом клеточных стенок грамотрицательных бактерий — ЛПС. Этот тип НЕТоза был индуцирован взаимодействием TLR4-активированных тромбоцитов с нейтрофилами и происходил с выбросом ядерного хроматина, но без участия NADPH-оксидазы. В системе *in vivo* Ипп и соавт. [39] также показали стимуляцию витального выброса хроматина опсонизированными грамположительными бактериями, который был опосредован TLR2

и комплементом. Интересно, что такие нейтрофилы были способны к хемотаксису и фагоцитозу бактерий после образования нейтрофильных ловушек [39].

В 2010 г. Пилсчек и соавт. [40] описали выброс хроматина в составе везикул в ответ на токсин *Staphylococcus aureus* (Пантон-Валентина лейкотоксин) без активации NADPH-оксидазы.

В работах, выполненных под руководством Симона [4, 41], был описан прижизненный выброс хроматина нейтрофилами и эозинофилами, праймированными провоспалительными цитокинами GM-CSF и IL-5/IFN- γ соответственно, и стимулированными ЛПС. При этом оба типа гранулоцитов выбрасывали хроматин исключительно митохондриального происхождения, а сам процесс зависел от активности NADPH-оксидазы. Интересно, что эозинофильный хроматин, как и нейтрофильный, обладал бактерицидной активностью.

Удивительно, что витальный выброс хроматина был также обнаружен у лимфоцитов. Так, в оригинальной работе Ингельсон и соавт. [7] было впервые показано, что В-лимфоциты, Т-лимфоциты и натуральные киллерные клетки, выделенные из крови здоровых доноров, а также В-клетки пациентов с хроническим лимфолейкозом осуществляли быстрый выброс митохондриальной ДНК в виде длинных филаментов в ответ на олигодезоксинуклеотиды С-класса. Филаменты, образуемые В-лимфоцитами, были подробно исследованы и оказалось, что они не связаны с образованием АФК и клеточной гибелью [7]. Масс-спектрометрический анализ филаментов ДНК показал, что по белковому составу они отличаются от NET и не обладают бактерицидностью. Кроме того, филаменты индуцировали синтез IFN I типа мононуклеарами периферической крови, выполняя роль сигнальных молекул, а не бактерицидных ловушек.

3. Роль NET в защите хозяина и в патологии

Биологическая роль NET стала очевидной после того, как были обнаружены заболевания, связанные с нарушением их образования. Впервые значение NET в защите хозяина было показано при изучении нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с ХГБ, имеющих мутантную NADPH-оксидазу и неспособных образовывать АФК. Такие пациенты страдают от рецидивирующих инфекций, наиболее частой причиной которых является инвазивный аспергиллез. Нейтрофилы таких больных также неспособны к образованию NET, однако генная терапия приводит к полному восстановлению этой функции нейтрофилов [14].

Вначале предполагали, что нейтрофилы образуют NET при столкновении с патогенами, которые они не способны фагоцитировать [42]. Одна-

ко данные, касающиеся способности NET убивать патогены, весьма противоречивы [28]. Оказалось, что способность NET к уничтожению того или иного патогена в значительной степени зависит от самого патогена, с которым сталкивается нейтрофил. Так, многие патогены синтезируют факторы вирулентности, например, капсулы [43] или эндонуклеазы [44], позволяющие им избежать действия нейтрофильных ловушек. В настоящее время считается общепризнанным, что NET предотвращают распространение инфекции из очага воспаления, способствуя их последующему уничтожению антимикробными белками и профессиональными фагоцитами.

После завершения инфекционного процесса NET должны быть элиминированы. Как показали Феррера и Фадил [45] в системе *in vitro*, вначале происходит деградация NET при участии ДНКазы I, после чего дебрис эндоситируется и лизируется макрофагами.

Однако неадекватное образование NET или, как иногда говорят, аберрантный NETоз, может привести к воспалительной и аутоиммунной патологии, а также к закупорке кровеносных сосудов. Такие состояния происходят как при гиперпродукции NET, так и при нарушении механизмов их устранения, например, в отсутствие ДНКазы I.

3.1. NET и воспалительные заболевания легких

При легочных заболеваниях NET могут играть как положительную, так и отрицательную роль. Так, было показано, что NET повышают вязкость слизи, защищающей организм от инфекции. NET были обнаружены в мокроте и других легочных секретах при бактериальных, грибковых и вирусных инфекциях [14, 46, 47]. Было также установлено, что NET участвуют в уничтожении *Aspergillus nidulans*, вызывающего тяжелый инвазивный аспергиллез легких [14].

Вместе с тем, при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) образование NET ухудшало функцию дыхания и вело к блокаде дыхательных путей, причем количество NET в мокроте пациентов с ХОБЛ коррелировало с тяжестью заболевания и составом микрофлоры [48].

При муковисцидозе или кистозном фиброзе также было обнаружено повышенное образование NET. Муковисцидоз представляет собой тяжелое наследственное заболевание, обусловленное мутацией гена *CFTR*, следствием которой является нарушение структуры и функции белка, получившего название «муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости». Мутации этого гена приводят к нарушению нормального транспорта ионов Cl^- через эпителий клеток и, как следствие, вызывают дегидратацию, сгущение секретов желез внешней секреции и затруднение их оттока. В случае легочной формы муковисци-

доза повышенная вязкость мокроты способствует колонизации легких бактериальной микрофлорой. Бактериальная колонизация далее привлекает нейтрофилы и стимулирует их к образованию NET, что еще сильнее повышает вязкость мокроты и снижает функцию дыхания у таких пациентов. Интересно, что ингаляция рекомбинантной ДНКазой улучшала функцию легких при муковисцидозе, а нейтрофильная эластаза способствовала растворению мокроты, делая ее более доступной для ДНКазы [49].

Острое повреждение легких (ОПЛ) и более тяжелый острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) вызывают быстрое развитие легочной недостаточности и могут быть обусловлены разнообразной этиологией. У пациентов с трансфузионно-обусловленным ОПЛ содержание NET в плазме крови было более высоким, чем у людей без ОПЛ [50]. На животных моделях было также показано, что NET образуются в ответ на стимулы, индуцирующие ОПЛ, а ингибиторы NET снижают тяжесть заболевания и повышают выживаемость [50]. Нейтрофилы пациентов с ОРДС, обусловленным пневмонией, были праймированы к образованию NET, а степень прайминга и содержание NET в крови коррелировали с тяжестью заболевания и смертностью [51]. У пациентов с ОРДС было также обнаружено повышенное содержание гистонов в бронхоальвеолярном лаваже и плазме [52], что, вероятно, частично обусловлено образованием NET.

Тяжелая острая респираторная инфекция COVID-19 (corona virus disease-19), впервые зарегистрированная в декабре 2019 г. в китайском городе Ухань и впоследствии переросшая в пандемию, поразила на сегодняшний день более 35 млн человек из 250 стран. Заболевание было вызвано новым коронавирусом SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) и сопровождалось гриппоподобными симптомами и вирусной пневмонией, часто переходящей в ОРДС и полиорганную недостаточность [53].

Одним из признаков тяжелого протекания COVID-19 является повышенный уровень периферических нейтрофилов [54]. Предполагают, что активация NET может лежать в основе патогенеза этого заболевания. В оригинальной работе Цзо и соавт. [55] был впервые показан повышенный уровень маркеров NET (свободной ДНК, комплексов МПО-ДНК и цитруллинированного гистона H3) в сыворотках инфицированных SARS-CoV-2 пациентов. Более того, концентрация свободной ДНК коррелировала с уровнем белка острой фазы – С-реактивным белком, маркером тромбоза D-димером и маркером гибели клеток лактатдегидрогеназой, а также с абсолютным количеством нейтрофилов. Интересно, что сыворотки пациентов с COVID-19 индуцировали образование NET нейтрофилами здоровых доно-

ров в системе *in vitro*. Активаторами НЕТоза, по предположению авторов, могли быть эпителиальные клетки, пораженные вирусом, активированные тромбоциты и эндотелиальные клетки, а также провоспалительные цитокины: IL-1 β , IL-8, G-CSF.

3.2. NET и тромбообразование

NET играют важную роль в тромбообразовании [56], активируя тромбоциты и индуцируя коагуляцию [57]. Пока неизвестно, играют ли NET-индуцированный тромбоз/коагуляция роль во врожденном иммунитете, обеспечивая гомеостаз организма, или являются патологическим следствием aberrантного НЕТоза. Однако на многочисленных моделях тромботических заболеваний было показано, что добавление ДНКазы существенно снижает закупорку сосудов [58]. Недавно проведенный анализ сердечно-сосудистых заболеваний человека показал, что прогноз и тяжесть таких заболеваний коррелируют с наличием свободной ДНК [59]. У человека NET были обнаружены при инсульте [60], тромботических микроангиопатиях [61], атеросклерозе [62] и антифосфолипидном синдроме [63]. И хотя роль NET в патогенезе перечисленных заболеваний до конца не выяснена, на модели атеросклероза установлено, что дефицит сериновой протеазы или введение ДНКазы снижают размер атеросклеротических бляшек [62].

Агрегированные NET были индуцированы микрокристаллами карбоната кальция и изменением pH [64], что вело к закупорке панкреатического протока и панкреатиту. Добавление ДНКазы в модели панкреатита мышей смягчало тяжесть заболевания [65].

Подагра развивается в результате накопления кристаллов натриевых солей мочевой кислоты (уратов), вызывающих временные артриты. Кристаллы уратов индуцируют образование агрегированных NET с высокой концентрацией протеаз, способных деградировать провоспалительные цитокины и хемокины [66]. Деградация цитокинов при подагре при участии NET предотвращала развитие хронического заболевания [66].

3.3. NET и рак

Рак является гетерогенным заболеванием, и роль NET в онкологии зависит от типа опухоли. На моделях рака молочной железы было показано, что NET способствуют метастазированию, поскольку этот процесс подавлялся введением ДНКазы [67]. Считается, что NET-индуцированная коагуляция является осложнением ряда онкологических заболеваний [68]. На модели рака кишечника было показано, что ДНКазы снижают коагуляцию и канцерогенез [69]. С другой стороны, терапевтическое вирусное инфицирование опухолей индуцировало обусловленную нейтро-

филами внутриопухолевую коагуляцию и уничтожение раковых клеток. Однако предстоит еще выяснить, действительно ли этот процесс связан с образованием NET [70].

3.4. NET и аутоиммунные заболевания

NET играют важную роль в аутоиммунитете [19, 71]. Так, у пациентов с СКВ, РА и васкулитами, ассоциированными с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА-ассоциированные васкулиты — ААВ) были обнаружены аутоантитела, распознающие такие компоненты NET, как двуспиральную ДНК [72], цитруллинированные белки [73] и компоненты азурофильных гранул [74] соответственно. Эти антитела могут появляться благодаря длительному присутствию NET, обусловленному их избыточным образованием или сниженной способностью их деградации ДНКазой I. Было показано, что генетически обусловленные дефициты ДНКазы ведут к развитию ювенильной формы СКВ [75]. Кроме того, на модели РА было установлено, что поглощение NET антиген-презентирующими клетками управляет аутоиммунным процессом, поскольку фибробласты, нагруженные NET, стимулировали образование антител против цитруллинированных пептидов [76]. Интересно, что антитела против NET были также способны ингибировать деградацию ловушек, обостряя тем самым заболевание [77]. Иммуные комплексы с компонентами NET были обнаружены при гломерулонефрите (клубочковый нефрит), распространенном осложнении при СКВ и ААВ [77, 78]. Было показано, что антигистоновые антитела защищают мышей от развития почечной недостаточности на модели некротизирующего гломерулонефрита [79].

3.5. Сепсис

Сепсис представляет собой острое осложнение тяжелого инфекционного процесса, характеризующегося высокой смертностью. Патология этого системного заболевания сложная, но, как было выяснено, NET могут способствовать выживанию при сепсисе. Оказалось, что нейтрофилы пациентов, выживших после сепсиса, производят больше NET в системе *in vitro*, чем нейтрофилы впоследствии умерших пациентов [80]. Это может быть отчасти обусловлено бактерицидным действием NET на ранних стадиях заболевания. Так, на мультимикробной мышинной модели было показано, что введение ДНКазы ускоряло развитие сепсиса [81]. Однако по мере прогрессирования заболевания NET могут повреждать легкие (ОПЛ и ОРДС) и печень [82, 83]. Интересно, что прямые инъекции мышам гистонов имитировали сепсис, а антигистоновые антитела защищали мышей на многочисленных инфекционных моделях [84]. Тромбоз также может вносить вклад в поврежде-

ние органов при сепсисе. Так же, как и при тромботических заболеваниях, наличие свободной ДНК коррелировало с тяжелым течением сепсиса у пациентов и с повреждением органов у мышей [85]. Введение ДНКазы снижало выраженность повреждения органов и повышало выживаемость мышей, но только в сочетании с антибиотикотерапией [85]. Эти факты указывают на двойственную роль NET в сепсисе: положительную на ранних стадиях заболевания и отрицательную на поздних стадиях, ассоциированных с патологией органов.

Заключение

На сегодняшний день расшифрованы многие сигнальные пути, ведущие к образованию NET. Показано, что NET могут быть индуцированы большим количеством как физиологических (микроорганизмы и их компоненты), так и фармакологических стимулов. Установлено существование двух механизмов образования NET: классического (или суицидального), приводящего к гибели клетки (NETоз), и витального, при котором клетки сохраняют не только свою жизнеспособность, но и все естественные эффекторные функции. Установлено, что необходимым участником классического NETоза является ферментный комплекс NADPH-оксидаза и образованные при его участии АФК. Однако при активации NETоза другими стимулами, например, Ca^{2+} -ионофорами, «в игру вступают» митохондриальные АФК.

После открытия NET оказалось, что эти структуры являются источником антигенов и поддерживают, а часто и активируют аутоиммунные процессы [71, 72]. Так, NET были обнаружены в сыворотках больных практически всеми аутоиммунными заболеваниями, включая СКВ, РА, псориаз и другие. NET были обнаружены при многих воспалительных неинфекционных заболеваниях, например, болезни Альцгеймера, панкреатите, раке (таблица). В этой связи создание лекарственных средств для лечения перечисленных заболеваний в значительной степени зависит от расшифровки сигнальных путей, ведущих к образованию NET, и их таргетных медиаторов. И хотя за прошедшие 16 лет с момента первого описания NET многие механизмы и медиаторы были расшифрованы, остается еще достаточное количество невыясненных вопросов, ответы на которые ожидаются в ближайшее время.

Работа выполнена в рамках проекта «Молекулярные и клеточные основы иммунитета» (госбюджет, раздел 0110 (для тем по госзаданию), номер 21-1-16, номер ЦИТИС АААА-А16-116021660081-0).

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Таблица

Заболевания, связанные с образованием NET

Заболевание	Ссылки	Биомаркеры	Результаты
Нейродегенеративные заболевания			
Болезнь Альцгеймера	[86]	дсДНК	В сосудах и паренхиме головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, а также на животных моделях были обнаружены NET, что указывало на их потенциальную повреждающую роль при этом заболевании.
Воспалительные заболевания легких			
Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)	[48]	ДНК-НЭ-комплексы, гистон-НЭ-комплексы, свободная ДНК	Обнаружено повышенное образование NET у пациентов с тяжелой формой ХОБЛ.
Муковисцидоз (кистозный фиброз, КФ)	[49]	NET, НЭ	Повышенная вязкость мокроты, характерная для больных КФ, была частично обусловлена образованием NET. Ингаляция рекомбинантной ДНКазы улучшала функцию легких при КФ, а НЭ способствовала растворению мокроты, делая ее более доступной для эндогенной ДНКазы.
Острое повреждение легких (ОПЛ)	[50]	дсДНК, гистоны	У пациентов с трансфузионно-обусловленным ОПЛ содержание NET в плазме крови было более высоким, чем у людей без ОПЛ. На животных моделях было также показано, что NET образуются в ответ на стимулы, индуцирующие ОПЛ, а ингибиторы NET снижают тяжесть заболевания и повышают выживаемость.
Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС)	[51]	ДНК-МПО-комплексы	Нейтрофилы пациентов с ОРДС, обусловленным пневмонией, были праймированы к образованию NET, а степень прайминга и содержание NET в крови коррелировали с тяжестью заболевания и смертностью.
Астма	[87]	дсДНК, NET	Показана ассоциация дсДНК с воспалением дыхательных путей, обусловленным нейтрофилами, увеличением содержания растворимых компонентов NET и повышением содержания каспазы-1 и IL-1 β . В экспериментах <i>in vitro</i> NET вызывали цитотоксический эффект по отношению к эпителиальным клеткам дыхательных путей, который подавлялся добавлением ДНКазы.
Тяжелая острая респираторная инфекция COVID-19	[55]	дсДНК, МПО-ДНК-комплексы, цитр. гистон H3	Впервые показан повышенный уровень маркеров NET в сыворотке крови инфицированных SARS-CoV-2 пациентов. Концентрация свободной ДНК коррелировала с уровнем белка острой фазы – С-реактивным белком, маркером тромбоза D-димером и маркером гибели клеток лактатдегидрогеназой, а также абсолютным количеством нейтрофилов.
Воспалительные заболевания кишечника			
Болезнь Крона (БК)	[88]	дсДНК, МПО	Показана повышенная экспрессия цитруллинированного гистона H3 и PAD4, а также способность нейтрофилов к образованию NET у мышей с индуцированной БК. Ингибирование медиатора NETоза PAD4 с помощью хлорамидина эффективно снижало клинические признаки БК и воспаление тканей.
Язвенный колит (ЯК)	[89]	дсДНК, МПО-ДНК-комплексы	Сравнивали экспрессию NET-ассоциированных белков в биопсийном материале кишечника, полученного от пациентов с ЯК, БК и у здоровых доноров. Показали, что экспрессия NET-ассоциированных белков в воспаленном кишечнике пациентов с ЯК значительно выше, чем у пациентов с БК и здоровых доноров. Циркулирующие нейтрофилы пациентов с ЯК образовывали NET в ответ на TNF- α , а при лечении антицитокиновыми ингибиторами выход NET и экспрессия NET-ассоциированных белков снижались. Авторы полагают, что NET играют существенную роль в поддержании воспаления слизистой оболочки при ЯК.
Аппендицит	[1]	дсДНК, NET	NET были обнаружены в большом количестве в содержимом аппендикса при аппендиците.
Заболевания поджелудочной железы			
Панкреатит	[64]	МПО, дсДНК	Показано, что образование NET в протоках поджелудочной железы, вызванное микрокристаллами карбоната кальция, может привести к развитию панкреатита.
Аномалия беременности			
Преэклампсия (ПЭ)	[90]	NET	ПЭ представляет собой тяжелое заболевание, возникающее на поздних сроках беременности и характеризующееся повышенным артериальным давлением и протеинурией у женщин, не страдавших этими недугами до беременности. ПЭ – мультисистемное нарушение беременности, обусловленное спазмом сосудов и дисфункцией эндотелия как у матери, так и плода. Это происходит благодаря повышенному выбросу воспалительных фрагментов синцитиотрофобласта (STBM), обусловленному его аномальным развитием. Авторы показали, что STBM активируют нейтрофилы и индуцируют образование NET <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> .

Продолжение таблицы

Заболевание	Ссылки	Биомаркеры	Результаты
Заболевания, связанные с тромбообразованием			
Ишемический инсульт	[60]	NET	Гистологический анализ артериальных тромбов при ишемическом инсульте показал наличие NET в 100% случаев, что коррелировало с плохим прогнозом.
Атеросклероз	[62]	дсДНК, нуклеосомы, цитр. гистон H4, МПО-ДНК-комплексы	Впервые обнаружен повышенный уровень дсДНК, нуклеосом и МПО-ДНК-комплексов у пациентов с тяжелым атеросклерозом по сравнению с показателями у здоровых доноров.
Тромботические микроангиопатии	[61]	дсДНК	Показана связь между образованием NET и повреждением эндотелия сосудов, активацией комплемента и тромботической микроангиопатией при трансплантации.
Антифосфолипидный синдром (АФС)*	[63]	дсДНК, МПО-ДНК-комплексы, NET, нейтрофилы низкой плотности	АФС представляет собой аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, вызванное антифосфолипидными антителами (АФА). АФС провоцирует образование тромбов (тромбоз) как в артериях, так и венах, а также такие связанные с беременностью осложнения, как выкидыш, мертворождение, преждевременные роды и тяжелая ПЭ. В работе был обнаружен повышенный уровень свободной ДНК и NET в сыворотках и плазме пациентов с АФС. Нейтрофилы пациентов с АФС были предрасположены к спонтанному образованию NET. Сыворотки пациентов с АФС и их IgG-антитела стимулировали образование NET нейтрофилами здоровых доноров. Образование NET, стимулированное АФА, подавлялось ингибиторами АФС.
Аутоиммунные заболевания			
Системная красная волчанка (СКВ)	[72]	МПО-ДНК-комплексы	Впервые была исследована роль NET при СКВ человека и их связь с тяжестью заболевания. Показан повышенный уровень NET у пациентов с СКВ, ассоциированный с количеством иммунных комплексов.
Ювенильная форма СКВ	[75]	дсДНК, МПО-ДНК-комплексы	Авторами была обнаружена редкая аутосомно-рецессивная форма СКВ, обусловленная мутацией гена <i>DNAse1L3</i> и встречающаяся исключительно в детском возрасте. Показана важная роль нарушения утилизации деградированной ДНК в патогенезе СКВ.
Ревматоидный артрит (РА)	[73]	цитр. гистон H4	Показано, что цитруллинированный гистон H4 и NET являются мишенями аутоантител, выделенных из сывороток крови пациентов с РА.
Псориаз	[19]	дсДНК, МПО-ДНК-комплексы	Псориаз представляет собой хроническое неинфекционное заболевание, дерматоз, поражающее в основном кожу. В настоящее время предполагается аутоиммунная природа этого заболевания. В многочисленных исследованиях было показано, что нейтрофилы, привлекаемые в псориазные поражения, кластеризуются с образованием провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и IL-17s. IL-17 индуцирует экспрессию кератиноцитами антимикробного пептида LL-37, происходящего из кателицидина, и дефензинов. Эти провоспалительные агенты стимулируют образование NET и патологическое состояние в отсутствие инфекции у таких пациентов.
АНЦА-ассоциированные васкулиты	[74]	МПО	Впервые у пациентов с системным васкулитом показано наличие аутоантител, специфичных к МПО.
Диабет I типа (Д1Т)	[91]	дсДНК, МПО-ДНК-комплексы	Д1Т — аутоиммунное заболевание, характеризующееся разрушением β-клеток поджелудочной железы (ПЖ), что приводит к гипергликемии — повышенному уровню сахара в крови. Ранее авторами было показано, что количество циркулирующих нейтрофилов снижено у пациентов с Д1Т. В работе установлено, что степень подавления функции β-клеток ПЖ коррелирует со снижением количества периферических нейтрофилов в крови у пациентов с Д1Т; нейтрофилы инфильтруют ПЖ задолго до появления симптомов Д1Т; часть нейтрофилов, заселивших ПЖ, выбрасывает NET, что указывает на их специфическую патогенетическую роль. NET и ДНК/антиДНК-IgG-иммунные комплексы ПЖ активируют плазматический дендритный клетки, стимулируя их к синтезу интерферонов I типа, запускающих в свою очередь аутоиммунные процессы, опосредованные Т-лимфоцитами.
Онкологические заболевания			
Метастазирующий рак молочной железы	[67]	NET	Показано, что метастазирующие клетки опухоли молочной железы индуцируют образование NET, поддерживающих в свою очередь метастазирование. Подавление образования NET или разрушение NET с помощью ДНКазы I приводило к ингибированию этого процесса.

Продолжение таблицы

Заболевание	Ссылки	Биомаркеры	Результаты
Опухоль тонкого кишечника	[69]	Нейтрофилы низкой плотности, NET, МПО	Впервые на модели рака тонкого кишечника показана связь канцерогенеза с гиперкоагуляцией и нейтрофилией. Гиперкоагуляция коррелировала с появлением нейтрофилов низкой плотности, спонтанно подвергающихся НЕТОзу.
Карцинома легкого Льюиса	[92]	NET, цитр. гистон H3	Впервые показано, что клетки карциномы легкого Льюиса активно высвобождают белок HMGB1 (high mobility group box 1), способствующий образованию NET.
Оториноларингологические заболевания			
Воспаление среднего уха (отит)	[93]	NET	На модели отита мышей показано, что совместное инфицирование <i>Streptococcus pneumoniae</i> и вирусом гриппа группы А способствует репликации пневмококков. Это явление обусловлено антител-зависимым образованием в среднем ухе NET, способствующих дальнейшему размножению пневмококков.
Хронический риносинусит (ХР)	[94]	дсДНК, цитр. гистон H3	Впервые показано повышение образования NET в назальных секретах при обострении риносинусита, способствующее секреции хемокинов и инфильтрации нейтрофилов.
Заболевания глаз			
Синдром сухого глаза (ССГ)	[95]	NET	Показан высокий уровень NET и их компонентов на поверхности глаз, а также недостаток нуклеаз в слезной жидкости у пациентов с ССГ. Лечение тяжелой формы ССГ глазными каплями, содержащими рекомбинантную ДНКазу I, приводило к снижению уровня NET и значительному улучшению состояния глаз. Установлено, что индуктором образования NET при ССГ является гиперосмолярность слезной жидкости.
Бактериальный и грибковый кератит	[96, 97]	NET	Кератит – воспаление роговицы глаза, проявляющееся преимущественно ее помутнением, изъязвлением, болью и покраснением. Бактериальный кератит, часто связанный с бактериальной инфекцией <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , обычно возникает у лиц, носящих контактные линзы, и может привести к ухудшению зрения. В работе [96] показано, что NET играют положительную роль в защите роговицы от бактериальной инфекции. Показано участие NET в иммунном ответе на грибковую инфекцию роговицы глаза [97].
Стоматологические заболевания			
Пародонтит	[98]	цитр. гистон H3, МПО	Пародонтит – хроническое воспалительное заболевание, которое поражает ткани, поддерживающие зуб, и проявляется широким спектром клинических, микробиологических и иммунологических реакций. Развитие болезни начинается с образования сложной бактериальной биопленки, в которую входят около 700 видов бактерий. Биопленка образует оболочку корня зуба, а ее структура защищает зуб от антимикробных агентов. У здоровых людей существует гомеостаз между биопленкой пародонта и иммунными ответами хозяина. Однако у хозяина с ослабленным иммунитетом биопленка может способствовать развитию воспаления, которое приводит к дисбактериозу, дальнейшему разрушению пародонта и потере зуба. Установлено, что нарушение образования NET в тканях пародонта играет важную роль в патогенезе пародонтита.
Метаболические заболевания			
Подагра	[66]	NET, МПО, анти-микробный пептид LL-37, НЭ	Подагра представляет собой метаболическое заболевание, которое характеризуется отложением в различных тканях организма кристаллов уратов в форме моноурата натрия или мочевой кислоты. Авторами было показано, что НЕТОз, индуцированный кристаллами мочевой кислоты, сопровождается выбросом литических ферментов, которые расщепляют провоспалительные цитокины в очаге воспаления. Предполагается, что НЕТОз при подагре предотвращает развитие хронического заболевания.
Диабет 2 типа (Д2Т)	[99]	дсДНК, НЭ, МПО	Сахарный Д2Т (инсулиннезависимый диабет) – метаболическое заболевание, характеризующееся повышенным уровнем глюкозы в крови – хронической гипергликемией, развивающейся в результате нарушения взаимодействия инсулина с клетками тканей. Показано, что высокий уровень глюкозы в системе <i>in vitro</i> и гипергликемия у пациентов с Д2Т усиливают образование NET и маркеров NET соответственно, что указывает на связь нейтрофилов с воспалением и повреждением тканей при Д2Т.

Окончание таблицы

Заболевание	Ссылки	Биомаркеры	Результаты
Системные заболевания			
Сепсис	[85]	дсДНК, МПО-ДНК-комплексы	Сепсис представляет собой тяжелый воспалительный синдром, вызванный чрезмерным ответом иммунной системы на инфекцию. Показано, что NET систематически образуются при сепсисе и играют двойственную роль. С одной стороны, NET контролируют инфекцию, а с другой — вызывают повреждение тканей и органов.

* — заболевание относится также к группе аутоиммунных заболеваний.

Сокращения:

АНЦА-ассоциированные васкулиты (ААВ) — васкулиты, ассоциированные с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами;

АФК — активные формы кислорода;

дсДНК — двуспиральная ДНК;

ЛПС — липополисахарид;

МРО — миелопероксидаза;

НЕТоз — процесс образования NET, сопровождающийся гибелью нейтрофила;

НЭ — нейтрофильная эластаза;

ОПЛ — острое повреждение легких;

ОРДС — острый респираторный дистресс-синдром;

РА — ревматоидный артрит;

СКВ — системная красная волчанка;

ФМА — форбол 12-миристенат 13-ацетат;

ХГБ — хроническая гранулематозная болезнь;

ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких;

ПКС — протеинкиназа С;

цитр. гистон — цитруллинированный гистон;

mPTP — неселективная митохондриальная пора (mitochondrial permeability transition pore);

NADPH-оксидаза — оксидаза восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases);

NET — нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps);

PAD4 — пептидил-аргининдезаминаза 4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. 2004. Vol. 303. N 5663. P. 1532–1535.
2. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death // *Sci. STKE*. 2007. Vol. 2007. N 379: pe11.
3. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Vol. 18. N 2. P. 134–147.
4. Yousefi S., Gold J.A., Andina N., Lee J.J., Kelly A.M., Kozłowski E., Schmid I., Straumann A., Reichenbach J., Gleich G.J., Simon H.U. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14. N 9. P. 949–953.
5. Morshed M., Hlushchuk R., Simon D., Walls A.F., Obata-Ninomiya K., Karasuyama H., Djonov V., Eggel A., Kaufmann T., Simon H.U., Yousefi S. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils // *J. Immunol.* 2014. Vol. 192. N 11. P. 5314–5323.
6. von Köckritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P., Heinemann K., Norrby-Teglund A., Rohde M., Medina E. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation // *Blood*. 2008. Vol. 111. N 6. P. 3070–3080.
7. Ingelsson B., Söderberg D., Strid T., Söderberg A., Bergh A.C., Loitto V., Lotfi K., Segelmark M., Spyrou G., Rosén A. Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of Class C // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018. Vol. 115. N 3. P. E478–E487.
8. Granger V., Faille D., Marani V., Noël B., Gallais Y., Szely N., Flament H., Pallardy M., Chollet-Martin S., de Chaisemartin L. Human blood monocytes are able to form extracellular traps // *J. Leukoc. Biol.* 2017. Vol. 102. N 3. P. 775–781.
9. Chow O.A., von Köckritz-Blickwede M., Bright A.T., Hensler M.E., Zinkernagel A.S., Cogen A.L., Gallo R.L., Monestier M., Wang Y., Glass C.K., Nizet V. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps // *Cell Host Microbe*. 2010. Vol. 8. N 5. P. 445–454.
10. Zhang X., Zhuchenko O., Kuspa A., Soldati T. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7: 10938.
11. Hawes M., Allen C., Turgeon B.G., Curlango-Rivera G., Minh Tran T., Huskey D.A., Xiong Z. Root border cells and their role in plant defense // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016. Vol. 54. P. 143–161.
12. Belambri S.A., Rolas L., Raad H., Hurtado-Nedelec M., Dang P.M., El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits // *Eur. J. Clin. Invest.* 2018. Vol. 48. Suppl. 2: e12951.
13. Hakkim A., Fuchs T.A., Martinez N.E., Hess S., Prinz H., Zychlinsky A., Waldmann H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation // *Nat. Chem. Biol.* 2011. Vol. 7. N 2. P. 75–77.
14. Bianchi M., Hakkim A., Brinkmann V., Siler U., Seger R.A., Zychlinsky A., Reichenbach J. Restoration of

NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis // *Blood*. 2009. Vol. 114. N 13. P. 2619–2622.

15. Metzler K.D., Fuchs T.A., Nauseef W.M., Reumaux D., Roesler J., Schulze I., Wahn V., Papayannopoulos V., Zychlinsky A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity // *Blood*. 2011. Vol. 117. N 3. P. 953–959.

16. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis // *Cell Rep*. 2014. Vol. 8. N 3. P. 883–896.

17. Anzilotti C., Pratesi F., Tommasi C., Migliorini P. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease // *Autoimmun. Rev*. 2010. Vol. 9. N 3. P. 158–160.

18. Sollberger G., Choidas A., Burn G.L., Habenberger P., Di Lucrezia R., Kordes S., Menninger S., Eickhoff J., Nussbaumer P., Klebl B., Krüger R., Herzig A., Zychlinsky A. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps // *Science Immunol*. 2018. Vol. 3: eaar6689.

19. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity // *Autoimmun. Rev*. 2015. Vol. 14. N 7. P. 633–640.

20. Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps // *J. Exp. Med*. 2010. Vol. 207. N 9. P. 1853–1862.

21. Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 9. P. 2817–2822.

22. Mahomed A.G., Anderson R. Activation of human neutrophils with chemotactic peptide, opsonized zymosan and the calcium ionophore A23187, but not with a phorbol ester, is accompanied by efflux and store-operated influx of calcium // *Inflammation*. 2000. Vol. 24. N 6. P. 559–569.

23. Hu T.H., Bei L., Qian Z.M., Shen X. Intracellular free calcium regulates the onset of the respiratory burst of human neutrophils activated by phorbol myristate acetate // *Cell. Signal*. 1999. Vol. 11. N 5. P. 355–360.

24. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NADPH oxidase modulates Ca^{2+} -dependent formation of neutrophil extracellular traps // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2020. Vol. 75. N 3. P. 104–109.

25. Shishikura K., Horiuchi T., Sakata N., Trinh D.A., Shirakawa R., Kimura T., Asada Y., Horiuchi H. Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP // *Br. J. Pharmacol*. 2016. Vol. 173. N 2. P. 319–331.

26. Healy L.D., Puy C., Fernández J.A., Mitrugno A., Keshari R.S., Taku N.A., Chu T.T., Xu X., Gruber A., Lupu F., Griffin J.H., McCarty O.J.T. Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo // *J. Biol. Chem*. 2017. Vol. 292. N 21. P. 8616–8629.

27. Amulic B., Knackstedt S.L., Abu Abed U., Deigendesch N., Harbort C.J., Caffrey B.E., Brinkmann V., Heppner F.L., Hinds P.W., Zychlinsky A. Cell-cycle proteins control production of neutrophil extracellular traps // *Dev. Cell*. 2017. Vol. 43. N 4. P. 449–462.e5.

28. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., Brinkmann V., Bernuth H.V., Zychlinsky A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways // *eLife*. 2017. Vol. 6: e24437.

29. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release // *Front. Immunol*. 2013. Vol. 4: 38.

30. Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K., Malech H.L., Ledbetter J.A., Elkon K.B., Kaplan M.J. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease // *Nat. Med*. 2016. Vol. 22. N 2. P. 146–153.

31. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis*. 2020. Vol. 1866. N 5: 165664.

32. Geiszt M., Kapus A., Ligeti E. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? // *J. Leukoc. Biol*. 2001. Vol. 69. N 2. P. 191–196.

33. Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology // *Physiol. Rev*. 2015. Vol. 95. P. 1111–1155.

34. Wildhagen K.C., García de Frutos P., Reutelingsperger C.P., Schrijver R., Aresté C., Ortega-Gómez A., Deckers N.M., Hemker H.C., Soehnlein O., Nicolaes G.A. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis // *Blood*. 2014. Vol. 123. N 7. P. 1098–1101.

35. Bannister A.J., Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications // *Cell Res*. 2011. Vol. 21. N 3. P. 381–395.

36. Lewis H.D., Liddle J., Coote J.E., et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation // *Nat. Chem. Biol*. 2015. Vol. 11. N 3. P. 189–191.

37. Hamam H.J., Khan M.A., Palaniyar N. Histone acetylation promotes neutrophil extracellular trap formation // *Biomolecules*. 2019. Vol. 9. N 1: 32.

38. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood // *Nat. Med*. 2007. Vol. 13. N 4. P. 463–469.

39. Yipp B.G., Petri B., Salina D., Jenne C.J., Scott B.N.V., Zbytnuik L.D., Pittman K., Asaduzzaman M., Wu K., Meijndert H.C., Malawista S.E., de Boisleury Chevance A., Zhang K., Conly J., Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo // *Nat. Med*. 2012. Vol. 18. N 9. P. 1386–1393.

40. Pilsczek F.H., Salina D., Poon K.K., Fahey C., Yipp B.G., Sibley C.D., Robbins S.M., Green F.H.Y., Surette M.G., Sugai M., Bowden M.G., Hussain M., Zhang K., Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus* // *J. Immunol*. 2010. Vol. 185. N 12. P. 7413–7425.

41. Yousefi S., Mihalache C., Kozłowski E., Schmid I., Simon H.U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA

to form neutrophil extracellular traps // *Cell. Death. Differ.* 2009. Vol. 16. N 11. P. 1438–1444.

42. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens // *Nat. Immunol.* 2014. Vol. 15. N 11. P. 1017–1025.

43. Wartha F., Beiter K., Albiger B., Fernebro J., Zychlinsky A., Normark S., Henriques-Normark B. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps // *Cell. Microbiol.* 2007. Vol. 9. N 5. P. 1162–1171.

44. Wilton M., Halverson T.W.R., Charron-Mazenod L., Parkins M.D., Lewenza S. Secreted phosphatase and deoxyribonuclease are required by *Pseudomonas aeruginosa* to defend against neutrophil extracellular traps // *Infect. Immun.* 2018. Vol. 86. N 9: e00403-18.

45. Farrera C., Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process // *J. Immunol.* 2013. Vol. 191. N 5. P. 2647–2656.

46. Cortjens B., de Boer O.J., de Jong R., Antonis A.F., Sabogal Pineros Y.S., Lutter R., van Woensel J.B., Reinout A., Bem R.A. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease // *J. Pathol.* 2016. Vol. 238. N 3. P. 401–411.

47. Hamaguchi S., Seki M., Yamamoto N., Hirose T., Matsumoto N., Irisawa T., Takegawa R., Shimazu T., Tomono K. Case of invasive nontypable *Haemophilus influenzae* respiratory tract infection with a large quantity of neutrophil extracellular traps in sputum // *J. Inflamm. Res.* 2012. Vol. 5. P. 137–140.

48. Dicker A.J., Crichton M.L., Pumphrey E.G., et al. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. Vol. 141. N 1. P. 117–127.

49. Papayannopoulos V., Staab D., Zychlinsky A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy // *PLoS One.* 2011. Vol. 6. N 12: e28526.

50. Caudrillier A., Kessenbrock K., Gilliss B.M., Nguyen J.X., Marques M.B., Monestier M., Toy P., Werb Z., Looney M.R. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury // *J. Clin. Invest.* 2012. Vol. 122. N 7. P. 2661–2671.

51. Bendib I., de Chaisemartin L., Granger V., Schlemmer F., Maitre B., Hue S., Surenaud M., Beldi-Ferchiou A., Carteaux G., Razazi K., Chollet-Martin S., Dessap A.M., de Prost N. Neutrophil extracellular traps are elevated in patients with pneumonia-related acute respiratory distress syndrome // *Anesthesiology.* 2019. Vol. 130. N 4. P. 581–591.

52. Lv X., Wen T., Song J., Xie D., Wu L., Jiang X., Jiang P., Wen Z. Extracellular histones are clinically relevant mediators in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome // *Respir. Res.* 2017. Vol. 18. N 1: 165.

53. Pedersen S.F., Ho Y.C. SARS-CoV-2: a storm is raging // *J. Clin. Invest.* 2020. Vol. 130. N 5. P. 2202–2205.

54. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J., HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression // *Lancet.* 2020. Vol. 395. N 10229. P. 1033–1034.

55. Zuo Y., Yalavarthi S., Shi H., Gockman K., Zuo M., Madison J.A., Blair C.N., Weber A., Barnes B.J., Egeblad M., Woods R.J., Kanthi Y., Knight J.S. Neutrophil extracellular traps in COVID-19 // *JCI Insight.* 2020. Vol. 5. N 11: e138999.

56. Martinod K., Wagner D.D. Thrombosis: tangled up in NETs // *Blood.* 2014. Vol. 123. N 18. P. 2768–2776.

57. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D., Schatzberg D., Monestier M., Myers D.D., Wroblewski S.K., Wakefield T.W., Hartwig J.H., Wagner D.D. Extracellular DNA traps promote thrombosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107. N 36. P. 15880–15885.

58. Brill A., Fuchs T.A., Savchenko A.S., Thomas G.M., Martinod K., De Meyer S.F., Bhandari A.A., Wagner D.D. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice // *J. Thromb. Haemost.* 2012. Vol. 10. N 1. P. 136–144.

59. Jimenez-Alcazar M., Kim N., Fuchs T.A. Circulating extracellular DNA: cause or consequence of thrombosis? // *Semin. Thromb. Hemost.* 2017. Vol. 43. N 6. P. 553–561.

60. Novotny J., Oberdieck P., Titova A., et al. Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction // *Neurology.* 2020. Vol. 94. N 22. P. e2346–e2360.

61. Gloude N.J., Khandelwal P., Luebbering N., Lounder D.T., Jodele S., Alder M.N., Lane A., Wilkey A., Lake K.E., Litts B., Davies S.M. Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD // *Blood.* 2017. Vol. 130. N 10. P. 1259–1266.

62. Borissoff J.I., Joosen I.A., Versteyleen M.O., Brill A., Fuchs T.A., Savchenko A.S., Gallant M., Martinod K., Ten Cate H., Hofstra L., Crijns H.J., Wagner D.D., Kietselaer B.L.J.H. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013. Vol. 33. N 8. P. 2032–2040.

63. Yalavarthi S., Gould T.J., Rao A.N., Mazza L.F., Morris A.E., Nunez-Alvarez C., Hernandez-Ramirez D., Bockenstedt P.L., Liaw P.C., Cabral A.R., Knight J.S. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome // *Arthritis Rheumatol.* 2015. Vol. 67. N 11. P. 2990–3003.

64. Leppkes M., Maueroeder C., Hirth S., et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7: 10973.

65. Merza M., Hartman H., Rahman M., Hwaiz R., Zhang E., Renstrom E., Luo L., Morgelin M., Regner S., Thorlacius H. Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis // *Gastroenterology.* 2015. Vol. 149. N 7. P. 1920–1931.e8.

66. Schauer C., Janko C., Munoz L.E., et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines // *Nat. Med.* 2014. Vol. 20. N 5. P. 511–527.

67. Park J., Wysocki R.W., Amoozgar Z., et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps // *Sci. Transl. Med.* 2016. Vol. 8. N 361: 361ra138.

68. Levi M. Management of cancer-associated disseminated intravascular coagulation // *Thromb. Res.* 2016. Vol. 140. Suppl. 1. P. S66–S70.
69. Guglietta S., Chiavelli A., Zagato E., Krieg C., Gandini S., Ravenda P.S., Bazolli B., Lu B., Penna G., Rescigno M. Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7: 11037.
70. Breitbach C.J., De Silva N.S., Falls T.J., et al. Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus // *Mol. Ther.* 2011. Vol. 19. N 5. P. 886–894.
71. Gupta S., Kaplan M.J. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases // *Nat. Rev. Nephrol.* 2016. Vol. 12. N 7. P. 402–413.
72. Moore S., Juo H.H., Nielsen C.T., Tyden H., Bengtsson A.A., Lood C. Role of neutrophil extracellular traps regarding patients at risk of increased disease activity and cardiovascular comorbidity in systemic lupus erythematosus // *J. Rheumatol.* 2019. Vol. 47. N 10: 190875.
73. Pratesi F., Dioni I., Tommasi C., Alcaro M.C., Paolini I., Barbetti F., Boscaro F., Panza F., Puxeddu I., Rovero P., Migliorini P. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps // *Ann. Rheum. Dis.* 2014. Vol. 73. N 7. P. 1414–1422.
74. Falk R.J., Jennette J.C. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis // *N. Engl. J. Med.* 1988. Vol. 318. N 25. P. 1651–1657.
75. Al-Mayouf S.M., Sunker A., Abdwani R., et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus // *Nat. Genet.* 2011. Vol. 43. N 12. P. 1186–1188.
76. Carmona-Rivera C., Carlucci P.M., Moore E., et al. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis // *Sci. Immunol.* 2017. Vol. 2. N 10: eaag3358.
77. Hakkim A., Furnrohr B.G., Amann K., Laube B., Abed U.A., Brinkmann V., Herrmann M., Voll R.E., Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107. N 21. P. 9813–9818.
78. O'Sullivan K.M., Lo C.Y., Summers S.A., Elgass K.D., McMillan P.J., Longano A., Ford S.L., Gan P.Y., Kerr P.G., Kitching A.R., Holdsworth S.R. Renal participation of myeloperoxidase in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis // *Kidney Int.* 2015. Vol. 88. N 5. P. 1030–1046.
79. Kumar S.V., Kulkarni O.P., Mulay S.R., Darisipudi M.N., Romoli S., Thomasova D., Scherbaum C.R., Hohenstein B., Hugo C., Müller S., Liapis H., Anders H.J. Neutrophil extracellular trap-related extracellular histones cause vascular necrosis in severe GN // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015. Vol. 26. N 10. P. 2399–2413.
80. Park S.Y., Shrestha S., Youn Y.J., et al. Autophagy primes neutrophils for neutrophil extracellular trap formation during sepsis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017. Vol. 196. N 5. P. 577–589.
81. Meng W., Paunel-Görgülü A., Flohé S., Hoffmann A., Witte I., MacKenzie C., Baldus S.E., Windolf J., Lögters T.T. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice // *Crit. Care.* 2012. Vol. 16. N 4: R137.
82. Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A., Lochnit G., Barreto G., Galuska S.P., Lohmeyer J., Preissner K.T. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. N 2: e32366.
83. Weber C. Liver: neutrophil extracellular traps mediate bacterial liver damage // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015. Vol. 12. N 5: 251.
84. Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C.T., Semeraro F., Taylor F.B., Esmon N.L., Lupu F., Esmon C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis // *Nat. Med.* 2009. Vol. 15. N 11. P. 1318–1321.
85. Czaikoski P.G., Mota J.M., Nascimento D.C., Sonego F., Castanheira F.V., Melo P.H., Scortegagna G.T., Silva R.L., Barroso-Sousa R., Souto F.O., Pazin-Filho A., Figueiredo F., Alves-Filho J.C., Cunha F.Q. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis // *PLoS One.* 2016. Vol. 11. N 2: e0148142.
86. Pietronigro E.C., Bianca V.D., Zenaro E., Constantin G. NETosis in Alzheimer's disease // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8: 211.
87. Lachowicz-Scroggins M.E., Dunican E.M., Charbit A.R., et al. Extracellular DNA, neutrophil extracellular traps, and inflammasome activation in severe asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019. Vol. 199. N 9. P. 1076–1085.
88. Zhang T., Mei Y., Dong W., Wang J., Huang F., Wu J. Evaluation of protein arginine deiminase-4 inhibitor in TNBS-induced colitis in mice // *Int. Immunopharmacol.* 2020. Vol. 84: 106583.
89. Dinallo V., Marafini I., Di Fusco D., Laudisi F., Franzè E., Di Grazia A., Figliuzzi M.M., Caprioli F., Stolfi C., Monteleone I., Monteleone G. Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis // *J. Crohns Colitis.* 2019. Vol. 13. N 6. P. 772–784.
90. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia // *Hum. Immunol.* 2005. Vol. 66. N 11. P. 1146–1154.
91. Vecchio F., Lo Buono N., Stabilini A., et al. Abnormal neutrophil signature in the blood and pancreas of presymptomatic and symptomatic type 1 diabetes // *JCI Insight.* 2018. Vol. 3. N 18: e122146.
92. Zhou J., Yang Y., Gan T., Li Y., Hu F., Hao N., Yuan B., Chen Y., Zhang M. Lung cancer cells release high mobility group box 1 and promote the formation of neutrophil extracellular traps // *Oncol. Lett.* 2019. Vol. 18. N 1. P. 181–188.
93. Short K.R., von Köckritz-Blickwede M., Langereis J.D., Chew K.Y., Job E.R., Armitage C.W., Hatcher B., Fujihashi K., Reading P.C., Hermans P.W., Wijburg O.L., Diavatopoulos D.A. Antibodies mediate formation of neutrophil extracellular traps in the middle ear and facilitate secondary pneumococcal otitis media // *Infect. Immun.* 2014. Vol. 82. N 1. P. 364–370.

94. Hwang J.W., Kim J.H., Kim H.J., Choi I.H., Han H.M., Lee K.J., Kim T.H., Lee S.H. Neutrophil extracellular traps in nasal secretions of patients with stable and exacerbated chronic rhinosinusitis and their contribution to induce chemokine secretion and strengthen the epithelial barrier // *Clin. Exp. Allergy*. 2019. Vol. 49. N 10. P. 1306–1320.

95. Tibrewal S., Ivanir Y., Sarkar J., Nayeb-Hashemi N., Bouchard C.S., Kim E., Jain S. Hyperosmolar stress induces neutrophil extracellular trap formation: implications for dry eye disease // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2014. Vol. 55. N 12. P. 7961–7969.

96. Shan Q., Dwyer M., Rahman S., Gadjeva M. Distinct susceptibilities of corneal *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates to neutrophil extracellular trap-mediated immunity // *Infect. Immun*. 2014. Vol. 82. N 10. P. 4135–4143.

97. Jin X., Zhao Y., Zhang F., Wan T., Fan F., Xie X., Lin Z. Neutrophil extracellular traps involvement in corneal fungal infection // *Mol. Vis*. 2016. Vol. 22. P. 944–952.

98. Magán-Fernández A., Al-Bakri S.M., O'Valle F., Benavides-Reyes C., Abadía-Molina F., Mesa F. Neutrophil extracellular traps in periodontitis // *Cells*. 2020. Vol. 9. N 6: E1494.

99. Menegazzo L., Ciciliot S., Poncina N., Mazzucato M., Persano M., Bonora B., Albiero M., de Kreutzenberg S.V., Avogaro A., Fadini G.P. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes // *Acta Diabetol*. 2015. Vol. 52. N 3. P. 497–503.

Поступила в редакцию 12.08.2020 г.

После доработки 28.09.2020 г.

Принята в печать 03.10.2020 г.

REVIEW

Neutrophil extracellular traps: new aspects

N.V. Vorobjeva 

*Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Neutrophils are the first line of defense against invading pathogens in the focus of inflammation, where they use effector functions such as phagocytosis, degranulation and formation of reactive oxygen species (ROS). In 2004, Arturo Zychlinsky described an additional neutrophil effector function – the release of neutrophil extracellular traps or NETs. NETs consist of the modified chromatin “decorated” with bactericidal proteins from granules, nucleus, and cytoplasm. The release of NETs can be activated by a variety of physiological and pharmacological stimuli, and depends on the formation of ROS, the main source of which is enzymatic complex NADPH oxidase. In the process of NET formation, bactericidal granule components exit from granules into cytoplasm, the modification of histones leading to chromatin decondensation, the destruction of the nuclear envelope and cytoplasmic membrane, and the extrusion of chromatin outside the cell are taking place. However, the uncontrolled NET release is a provoking factor in the development of various inflammatory and autoimmune diseases. NETs have been discovered at autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, psoriasis, and vasculitis; NETs are involved in the pathogenesis of cardiovascular, pulmonary, and oncological diseases. In this review, the basic molecular mechanisms of NETs formation, as well as their role in the physiological processes and pathogenesis of a number of diseases including COVID-19 are discussed.

Keywords: *neutrophil, neutrophil extracellular traps, NETosis, NADPH oxidase, reactive oxygen species, thrombosis, sepsis*

Сведения об авторе

Воробьева Нина Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-46-46; e-mail: nvvorobjeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5233-9338>

ОБЗОР

УДК 577.175.44

Негеномное действие тиреоидных гормонов: роль в регуляции сосудистой системы

Е.К. Селиванова^{1,*} , О.С. Тарасова^{1,2} 

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

²Лаборатория физиологии мышечной деятельности, Институт медико-биологических проблем, РАН, Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское ш., 76А

*e-mail: selivanova@mail.bio.msu.ru

Негеномное действие тиреоидных гормонов (ТГ) проявляется в течение нескольких минут или часов и не зависит от связывания гормона с транскрипционно активными ядерными рецепторами TR α и TR β . Такое действие характеризуется разнообразием задействованных рецепторов и сигнальных путей, которые могут различаться в разных типах клеток. Тироксин и трийодтиронин способны оказывать негеномное влияние при взаимодействии с транскрипционно неактивными TR α и TR β в цитоплазме клетки, их укороченными изоформами или интегрином $\alpha\text{v}\beta 3$. При негеномном действии ТГ также могут изменять транскрипцию генов, но в этом случае их влияние распространяется на более широкий спектр генов, чем при геномном действии. Негеномное действие ТГ часто дополняет геномное, вызывая сходные изменения активности клеток, или же усиливает его, обеспечивая транслокацию TR α и TR β в ядро или их посттрансляционную модификацию. В сосудистом русле ТГ оказывают негеномное регуляторное влияние на ангиогенез и тонус сосудов (вызывают быструю вазодилатацию). Ключевой сигнальный каскад, опосредующий ангиогенез, включает интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$, протеинкиназу D и деацетилазу гистонов 5. Механизмы быстрой вазодилатации пока изучены недостаточно и могут различаться в разных регионах сосудистого русла. В цитоплазме эндотелиальных клеток негеномное влияние ТГ реализуется с участием рецептора TR $\alpha 1$, фосфоинозитид-3-киназы и NO-синтазы, однако такой механизм не является универсальным. ТГ также могут вызывать вазодилатацию артерий скелетных мышц при взаимодействии с интегрином $\alpha\text{v}\beta 3$, расположенным в гладкомышечных клетках, однако запускаемые им сигнальные каскады пока не изучены. Знание молекулярных механизмов негеномного влияния ТГ важно для разработки новых способов фармакологической коррекции сосудистых патологий, развитие которых связано с нарушениями тиреоидного статуса.

Ключевые слова: тиреоидные гормоны, негеномное влияние, ангиогенез, тонус сосудов, тетрак, интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$

1. Геномное и негеномное действие тиреоидных гормонов

Тиреоидные гормоны (ТГ) — тироксин (Т₄) и трийодтиронин (Т₃), — регулируют работу практически всех клеток организма, при этом их влияние может быть реализовано по двум механизмам: геномному и негеномному. При геномном («классическом») действии ТГ взаимодействуют с ядерными рецепторами — лиганд-зависимыми транскрипционными факторами, модулирующими экспрессию генов, содержащих тиреоид-чувствительные элементы [1]. Кроме того, комплексы ТГ с ядерными рецепторами могут модулировать транскрипцию генов, не содержащих тиреоид-чувствительные элементы, путем образования

комплексов с транскрипционными факторами в ядре [2].

Негеномный механизм действия ТГ изначально определили как быстрый (развивающийся в течение нескольких минут или часов) и не зависящий от транскрипции генов и синтеза белка [1, 3]. Впоследствии выяснилось, что термин «негеномное действие» является несколько парадоксальным, поскольку в результате негеномного действия может изменяться экспрессия определенных генов [4, 5]. В связи с этим некоторые исследователи предлагают иную классификацию механизмов действия ТГ, без использования терминов «геномный» и «негеномный» [6], хотя она еще не заменила прежнюю общепринятую классификацию, используемую нами в данном обзоре.

2. Молекулярные механизмы негеномного действия тиреоидных гормонов

Негеномное действие ТГ на клетки одной и той же ткани могут опосредовать рецепторы, локализованные в разных компартментах клетки – наружной мембране, цитоплазме или митохондриях [4, 7, 8]. В этом разделе будут рассмотрены известные на данный момент рецепторы и сигнальные пути, обеспечивающие негеномное действие ТГ (рис. 1).

2.1. Эффекты связывания T_3 и T_4 с цитоплазматическими белками

Негеномное действие ТГ может быть опосредовано функциональными ядерными рецептора-

ми (TR α 1 и TR β 1), локализованными в цитоплазме клетки. Эффекты, инициированные ядерными рецепторами, относятся к негеномным, если комплекс гормон-рецептор образуется вне ядра и не оказывает прямого влияния на экспрессию генов за счет связывания с тиреоид-чувствительными элементами или другими транскрипционными факторами [6]. Поскольку ядерные рецепторы обладают более высоким сродством к T_3 , чем к T_4 , данный вид негеномных влияний инициирует преимущественно T_3 [9].

Механизм негеномного действия ТГ, опосредованного TR β 1, включает образование комплекса с p85 α , регуляторной субъединицей фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), в цитоплазме клетки («1» на рис. 1).

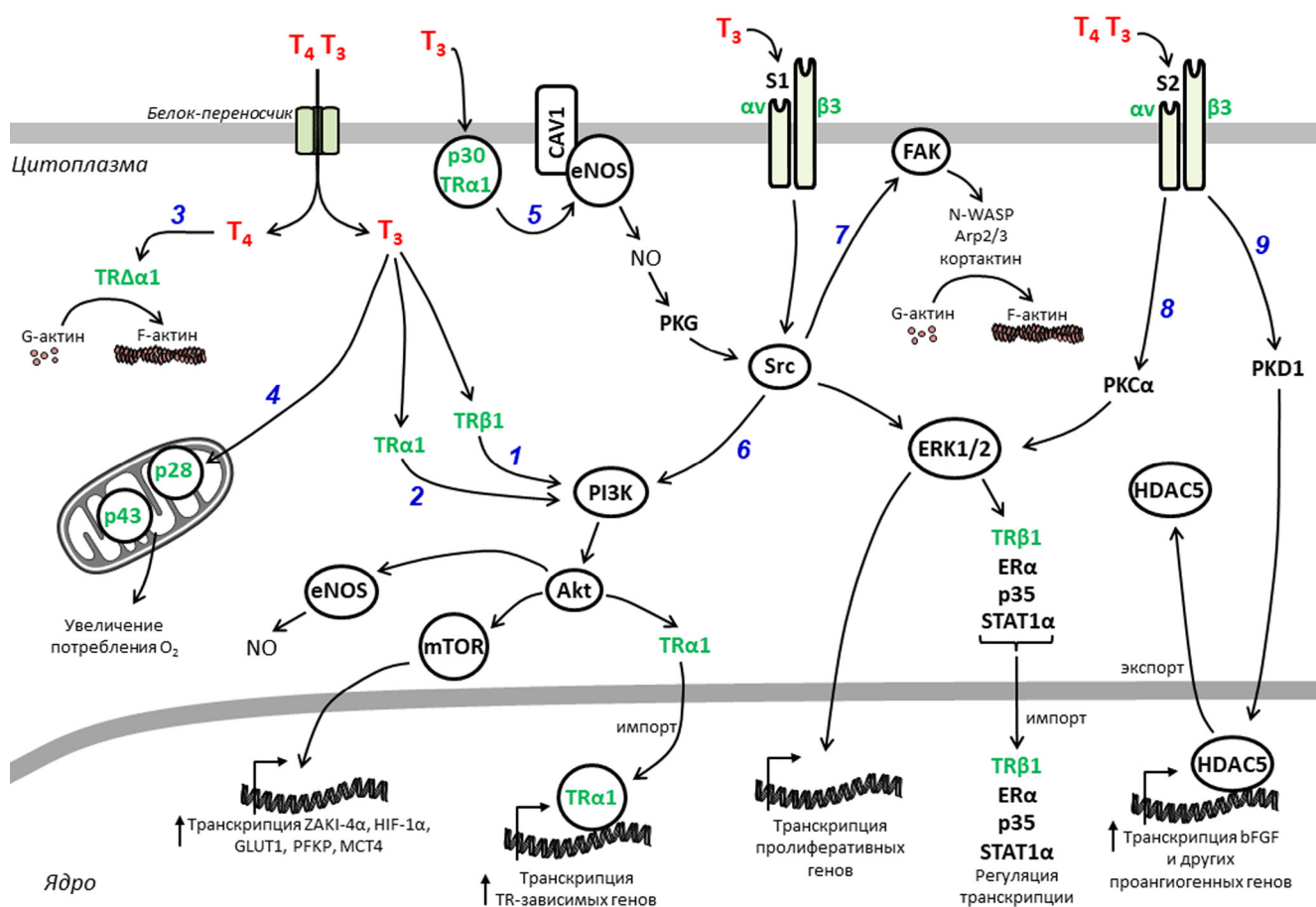


Рис. 1. Основные механизмы негеномного действия тиреоидных гормонов.

1 – T_3 через рецептор TR β 1 активирует каскад PI3K/Akt/mTOR, что приводит к повышению экспрессии генов HIF-1 α и белков, регулирующих углеводный обмен клетки; 2 – T_3 через рецептор TR α 1 активирует каскад PI3K/Akt и увеличивает активность eNOS, а также продукцию NO; 3 – T_4 через рецептор TR $\Delta\alpha$ 1 (укороченная изоформа TR α 1) стимулирует полимеризацию актина; 4 – T_3 связывается с митохондриальными белками p28 и p43 (укороченные изоформы TR α 1) и стимулирует окислительное фосфорилирование; 5 – T_3 связывается с p30 TR α 1 (укороченная изоформа TR α 1), последовательно активирует eNOS, Src-киназу и ERK1/2 и в итоге – усиливает пролиферацию клеток; 6 – T_3 связывается с сайтом S1 интегрин α v β 3 и через Src-киназу запускает каскад PI3K/Akt, стимулирующий импорт TR α 1 в ядро и экспрессию HIF-1 α ; 7 – T_3 связывается с сайтом S1 интегрин α v β 3 и через Src-киназу активирует FAK, стимулируя полимеризацию актина; 8 – T_3 и T_4 связываются с сайтом S2 интегрин α v β 3 и через PKC α активируют ERK1/2, стимулируя транскрипцию «пролиферативных» генов и импорт транскрипционных факторов в ядро; 9 – T_3 и T_4 связываются с сайтом S2 интегрин α v β 3 и активируют PKD1, которая стимулирует экспорт HDAC5 из ядра, увеличивая транскрипцию проангиогенных генов.

Обозначения: α v и β 3 – субъединицы интегрин α v β 3, CAV1 – кавеолин-1, eNOS – эндотелиальная NO-синтаза, ER α – рецептор эстрогенов, FAK – киназа фокальных контактов, F-актин – фибриллярный актин, G-актин – глобулярный актин, GLUT1 – глюкозный транспортер 1, HDAC5 – деацетилаза гистонов 5, PFKF – фосфофруктокиназа, PKC α – протеинкиназа α , PKD1 – протеинкиназа D1, PKG – протеинкиназа G, STAT1 α – транскрипционный фактор, ZAK1-4 α – эндогенный ингибитор кальцинеина. Стрелками указано активирующее влияние на мишени, если не помечено иное (импорт белков в ядро или их экспорт из ядра).

Например, добавление T_3 к культуре фибробластов кожи человека активирует PI3K и запускает каскад, в ходе которого происходят последовательная активация протеинкиназы Akt, активация комплекса mTOR и увеличение экспрессии фактора ZAKI-4 α , эндогенного ингибитора кальцинейрина, который является важным участником Ca^{2+} -сигналикации в различных клетках [10]. Аналогичным образом T_3 способен усиливать экспрессию некоторых других генов, включая гены индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α и его мишеней, регулирующих углеводный обмен клетки (глюкозный транспортер GLUT1, фосфофруктокиназа, монокарбоксилатный транспортер MCT4), что обеспечивает активацию гликолиза и может играть важную роль в адаптации клеток к гипоксии [11].

Рецептор TR α 1 также способен образовывать комплекс с p85 α в цитоплазме и активировать PI3K/Akt-каскад («2» на рис. 1). В культуре эндотелиальных клеток сосудов человека T_3 запускает данный каскад с последующим фосфорилированием эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в течение 10–20 мин [12]. Такая негеномная активация eNOS может объяснять быстрое падение артериального давления, наблюдающееся у мышей в ответ на внутривенное введение T_3 [12].

Укороченные изоформы ядерных рецепторов – TR $\Delta\alpha$ 1 и TR $\Delta\alpha$ 2, которые, в отличие от TR α 1 и TR α 2, не обладают транскрипционной активностью, также опосредуют негеномное действие ТГ («3» на рис. 1) [13]. Они широко представлены в цитоплазме клеток мозга, кишечника и легких крысы [14]. Интересно, что обе изоформы (TR $\Delta\alpha$ 1 и TR $\Delta\alpha$ 2) обладают более высокой аффинностью к T_4 и rT_3 (транскрипционно неактивный метаболит ТГ), чем к T_3 . Рецептор TR $\Delta\alpha$ 1 опосредует быстрое увеличение содержания полимеризованного актина при добавлении T_4 или rT_3 к культуре астроцитов [15, 16]. Этот эффект не связан с изменением содержания мРНК или белка актина в клетках, то есть не зависит от транскрипции. У мышей с нокаутом всех изоформ TR α (TR $\alpha^{0/0}$), но не с нокаутом только TR α 2 и TR $\Delta\alpha$ 2 (TR α 2 $^{-/-}$) нарушается формирование актинового цитоскелета в астроцитах [17]. Так как T_3 не влияет на полимеризацию актина в астроцитах, этот эффект, по всей видимости, опосредован не высокоаффинной к T_3 изоформой TR α 1, а именно TR $\Delta\alpha$ 1.

2.2. Действие T_3 и T_4 на митохондрии

Негеномное действие ТГ, как и геномное, приводит к увеличению потребления кислорода и скорости окислительного фосфорилирования в митохондриях [18]. В митохондриях, выделенных из печени крыс, были обнаружены две укороченные изоформы TR α 1: p43 (43 кДа), которая расположена в матриксе и имеет ДНК-связывающий домен, аналогичный таковому у TR α 1, и p28 (28 кДа), которая локализована во внутрен-

ней мембране и не имеет ДНК-связывающего домена («4» на рис. 1) [18–20]. Эффекты, инициируемые p28, могут вносить значительный вклад в тиреоидную регуляцию работы митохондрий, так как аффинность p28 к T_3 выше, чем p43 и полноразмерного TR α 1 [20].

2.3. Эффекты связывания T_3 и T_4 с мембранными белками

Почти 40 лет назад были обнаружены места связывания ТГ на мембране эритроцитов [21]. Впоследствии наличие мембранного рецептора ТГ было доказано путем использования конъюгата T_4 с агарозой, который не проникал внутрь клетки, но вызывал такие же эффекты, как и свободный T_4 [22].

Мембранными посредниками негеномного действия ТГ могут служить укороченные изоформы ядерных рецепторов. В экспериментах на культурах первичных остеобластов человека (hPOBs) и остеобласт-подобных клеток мыши (MC3T3) T_3 уже через несколько минут повышал уровень фосфорилирования и активности киназы Src, митоген-активируемых протеинкиназ ERK1/2 и киназы Akt. Анализ клеток с флуксированным геном TR α , а также генномодифицированных клеток, экспрессирующих разные изоформы TR α 1, показал, что для проявления данного эффекта необходима изоформа p30 TR α 1 (30 кДа), которая связана с липидными рафтами мембраны вместе с кавеолином-1 и eNOS. Связывание T_3 с p30 TR α 1 сопровождается повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и активацией eNOS, а далее – растворимой гуанилатциклазы и протеинкиназ G, Src, ERK1/2 и Akt («5» на рис. 1) [23]. Негеномные эффекты T_3 , опосредуемые p30 TR α 1, могут играть важную роль в созревании и росте кости.

Важную роль в мембранной рецепции ТГ играет интегрин $\alpha\beta$ 3 [24]. Интегрины – это трансмембранные белки, обеспечивающие взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом и передачу сигналов к цитоскелету клетки. Они состоят из двух субъединиц – α и β [25, 26]. Интегрин $\alpha\beta$ 3 – самый распространенный у млекопитающих, он экспрессируется практически на всех типах клеток. Это один из 8 интегринов, содержащих сайт узнавания последовательности Arg-Gly-Asp (RGD), с этим сайтом связываются коллаген, витронектин, фибронектин и остеопонтин [24, 27]. Именно вблизи сайта узнавания RGD расположены идентифицированные при помощи кристаллографического и компьютерного анализа сайты связывания ТГ – S1 и S2 [28]. Взаимодействие T_3 и T_4 с этими сайтами блокируется пептидом RGD или веществом тетрак (дезаминированный аналог тироксина), использование этих блокаторов позволяет подтвердить роль интегрин $\alpha\beta$ 3 как посредника негеномных влияний ТГ [29].

Домен S1 специфически связывает T_3 и активирует ассоциированную с внутриклеточной петлей интегрин Src -киназу («6» на рис. 1), как было показано в экспериментах на клеточной линии глиомы человека U-87 MG [29]. Src -киназа активирует каскад $\text{PI3K}/\text{Akt}$, в итоге происходит перемещение ядерных рецепторов $\text{TR}\alpha 1$ из цитоплазмы в ядро, а также увеличение экспрессии гена $\text{HIF-1}\alpha$ и, следовательно, устойчивости клеток к гипоксии [29]. Помимо этого, в результате связывания T_3 с интегрином и последующей активации Src -киназы и PI3K может происходить активация киназы фокальных контактов (ФАК) и белков, регулирующих полимеризацию актина, в частности, кортактина, N-WASP и Agr2/3 («7» на рис. 1). В клеточной линии рака молочной железы T-47D это приводит к реорганизации актинового цитоскелета, а также к усилению адгезии и миграции клеток [30].

Домен S2 способен связывать и T_3 , и T_4 , однако обладает более высоким сродством к T_4 [29]. Присоединение T_4 к домену S2 приводит к активации фосфолипазы C и далее протеинкиназы Ca , которая фосфорилирует и активирует ERK1/2 («8» на рис. 1) [29]. ERK1/2 перемещаются в ядро, где фосфорилируют $\text{TR}\beta 1$, в результате чего увеличивается количество рекрутированных ядерным рецептором коактиваторов транскрипции [31]. Кроме того, ERK1/2 могут фосфорилировать в цитоплазме такие белки, как $\text{TR}\beta 1$, рецептор эстрогенов $\text{ER}\alpha$, транскрипционный фактор $\text{STAT1}\alpha$ и белок p35 (активатор циклин-зависимой киназы 5), стимулируя их транслокацию в ядро [29, 32, 33].

Помимо сигнального пути ERK1/2 , связывание T_4 с интегрином может активировать еще один сигнальный каскад, впервые выявленный в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) [34]. В ходе него происходит активация протеинкиназы D1 (прежнее название — $\text{C}\mu$), которая фосфорилирует деацетилазу гистонов IIa-класса (HDAC5) («9» на рис. 1). HDAC5 подвергается экспорту из ядра, благодаря этому происходит усиление транскрипции генов-мишеней, отвечающих за ангиогенез, в том числе основного фактора роста фибробластов (bFGF). В итоге T_4 стимулирует миграцию эндотелиальных клеток и образование капилляроподобных трубочек — предшественников сосудов [34].

Нужно отметить, что на данный момент не для всех известных негеномных эффектов ТГ установлены опосредующие их рецепторы и сопряженные с ними сигнальные каскады. Например, T_3 стимулирует встраивание в мембрану и активность Na,K-ATF азы в альвеолярных клетках легких крыс за счет активации Src -киназы, PI3K и ERK1/2 , однако до сих пор неизвестно, какой тип рецепторов опосредует эти эффекты [35]. Часть негеномных действий ТГ изучена лишь на

феноменологическом уровне, в том числе — механизмы их быстрого влияния на тонус кровеносных сосудов [36].

3. Взаимодействие негеномного и геномного действия тиреоидных гормонов

Негеномное действие ТГ может реализовываться независимо от геномного. Например, именно за счет негеномного действия T_4 вызывает реорганизацию актинового цитоскелета и усиление миграции гранулярных клеток в эксплантате мозжечка [37]. Вместе с тем, негеномное влияние ТГ может дополнять, усиливать или подавлять эффекты их связывания с транскрипционно активными ядерными рецепторами в ходе геномного действия.

Дополнение наблюдается в том случае, когда негеномное действие качественно схоже с геномным, но предшествует ему. В качестве примера можно привести увеличение количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов в мембране кардиомиоцитов куриных эмбрионов. При добавлении T_3 плотность рецепторов значимо увеличивалась уже в течение 2 ч, причем этот эффект наблюдался и в присутствии ингибитора синтеза белка. Дальнейшее, уже зависимое от синтеза белка, увеличение плотности рецепторов наблюдалось через сутки после добавления T_3 , то есть негеномное и геномное влияния T_3 были качественно сходными, но проявлялись через разные временные интервалы [3].

Усиление геномного действия негеномным обычно происходит за счет увеличения количества или активности ядерных рецепторов ТГ в клетке. Например, показано, что связывание T_4 с интегрином $\alpha v\beta 3$ стимулирует интернализацию интегрин в клетках рака легких (H522) и опухоли яичников человека (OVCAR-3). В цитоплазме интегрин распадается на две субъединицы (αv и $\beta 3$), после чего субъединица αv транспортируется в ядро и образует комплекс с белками p300 и STAT1 , который усиливает транскрипцию гена, кодирующего рецептор $\text{TR}\beta 1$ [38]. В дополнение к этому, активация каскада PI3K под действием T_3 в течение часа приводит к увеличению содержания в клетках мРНК ядерного рецептора $\text{TR}\alpha 1$ [39].

Увеличение активности ядерных рецепторов ТГ связано с посттрансляционными модификациями или с изменением их клеточной локализации. Показано, что T_4 вызывает увеличение ERK -зависимого фосфорилирования рецептора $\text{TR}\beta 1$ в ядерной фракции клеток линии 293T, в результате $\text{TR}\beta 1$ диссоциирует от своего корепрессора SMRT , становится способным рекрутировать коактиваторы и усиливать транскрипцию генов-мишеней [31]. В экспериментах на этой же клеточной линии связывание T_4 или T_3 с интегрином $\alpha v\beta 3$ приводило к активации ERK1/2 и затем — к ацетилированию $\text{TR}\beta 1$ и его транс-

порту из цитоплазмы в ядро (рис. 1) [32, 40]. В экспериментах на клеточной линии GH4C1 для T_3 показана способность увеличивать ацетилирование $TR\alpha 1$, что повышает аффинность этого рецептора к гормону, а также рекрутирование коактиваторов, хотя точный механизм такого влияния пока неизвестен [41]. Помимо этого, связывание T_3 с интегрином $\alpha v\beta 3$ в клеточной линии U-87 MG потенцировало PI3K-зависимый транспорт $TR\alpha 1$ в ядро, что обеспечивало усиление геномного сигнала («6» на рис. 1) [29].

Подавление геномных влияний негеномными связано с конкуренцией за гормон между транскрипционно активными и неактивными изоформами ядерных рецепторов. У мышей с мутацией в гене $TR\alpha$ ($TR\alpha^{7/7}$), подавляющей экспрессию $TR\Delta\alpha 1$ и $TR\Delta\alpha 2$, но не влияющей на уровень белка $TR\alpha 1$ и $TR\alpha 2$, наблюдалось более сильное увеличение пролиферации клеток в криптах тонкого кишечника в ответ на введение T_3 по сравнению с диким типом, то есть $TR\Delta\alpha 1$ и $TR\Delta\alpha 2$ негативно регулировали чувствительность клеток к ТГ [13].

Наиболее распространенными типами взаимодействия быстрого негеномного и отложенного по времени геномного действия ТГ, по всей видимости, являются дополнение и усиление, обеспечивающие эффективную тиреоидную регуляцию клеточных процессов [42].

4. Негеномное действие тиреоидных гормонов на сосудистую систему

4.1. Общая характеристика тиреоидной регуляции сосудистой системы

ТГ играют важную роль в регуляции тонуса сосудов, что подтверждается выраженными изменениями гемодинамики при нарушениях тиреоидного статуса: при гипертиреозе наблюдается снижение сопротивления сосудов кровотоку, а при гипотиреозе, напротив, его увеличение [43, 44]. Это связано с непосредственным влиянием ТГ на рост, ветвление и функционирование сосудистой системы.

Стимуляция ангиогенеза — один из однозначно установленных негеномных эффектов ТГ в сосудистой системе [34]. Как при неонатальном гипертиреозе, так и при развитии гипертиреоза во взрослом возрасте наблюдается увеличение длины артериол и увеличение плотности капиллярной сети, в том числе в таких важных органах, как сердце и почки [45, 46]. Напротив, недостаток тиреоидного влияния замедляет развитие сосудистого русла, причем такие изменения носят долговременный характер и могут сохраняться во взрослом возрасте [45, 47]. В регуляции развития органов проявляется взаимодействие геномных и негеномных влияний ТГ [42].

Кроме того, ТГ могут снижать тонус кровеносных сосудов [48]. При использовании экспери-

ментальных моделей гипертиреоза показано, что ТГ могут уменьшать адренореактивность артерий [49, 50], усиливать их эндотелий-зависимое и эндотелий-независимое расслабление [51, 52]. Напротив, хронический недостаток ТГ вызывает увеличение тонуса артерий [53]. Сходные изменения тонуса артерий при остром и хроническом гипертиреозе [52, 54], а также быстрая динамика сосудоэксциративных реакций на T_3 или T_4 [55] предполагают, что вклад негеномных механизмов в тиреоидную регуляцию тонуса сосудов может быть весьма значительным.

4.2 Негеномная тиреоидная регуляция ангиогенеза

В регуляции ангиогенеза участвуют как T_4 , так и T_3 , молекулярные механизмы влияния которых на рост сосудов уже рассматривались выше (см. раздел 2.3). T_4 инициирует ангиогенез путем связывания с сайтом S2 интегрин $\alpha v\beta 3$ [34]. В результате активации каскада $\alpha v\beta 3$ /PKD/HDAC5 в эндотелиальных клетках происходит увеличение экспрессии проангиогенных генов, в том числе гена bFGF [34]. Важно, что T_4 способен вызывать ангиогенный эффект в концентрациях 10–100 нМ [24], что соответствует его физиологическим концентрациям в крови [56].

Кроме того, ТГ способны вызывать ангиогенез через увеличение экспрессии HIF-1 α . Индукция транскрипции этого гена происходит при связывании T_3 с S1-сайтом интегрин $\alpha v\beta 3$ [29]. Именно увеличение экспрессии HIF-1 α опосредует стимуляцию ангиогенеза при гипоксии [57].

Тетрак (ингибитор интегрин $\alpha v\beta 3$) подавляет влияние ТГ на ангиогенез [58]. Вместе с тем показано, что тетрак может ингибировать ангиогенез и в отсутствие ТГ. По всей видимости, это связано с влиянием тетрака на взаимодействие между интегрином $\alpha v\beta 3$ и рецепторами ангиогенных факторов роста VEGF и bFGF [57, 59]. Тетрак и другие ингибиторы интегрин $\alpha v\beta 3$ имеют большой терапевтический потенциал в предотвращении васкуляризации опухолей [60].

4.3. Негеномная тиреоидная регуляция тонуса сосудов

Наиболее явным и известным уже продолжительное время негеномным влиянием ТГ на сосуды является быстрое расширение сосудов (вазодилатация), которое развивается в течение нескольких минут после добавления гормона [61, 62]. Такой эффект обнаружен у крысы [63], мыши [64], хомяка [65], кролика [66] и человека [67, 68]. Быстрая вазодилатация наблюдается как в артериях эластического типа, таких как аорта [63] или бедренная артерия [69], так и в более мелких артериях мышечного типа, например, в коронарных артериях [61], артериях тонкого кишечника [70], внутренней грудной артерии [67] и артериях скелетных мышц [71, 72]. Обобщение данных о бы-

строй вазодилатации под действием ТГ приведено в таблице.

В большинстве экспериментов исследовали сосудорасширяющее действие только одной формы ТГ — T_3 , однако в ряде работ проведено сравнение влияния T_3 и T_4 . Было показано, что в коронарных артериях крысы T_3 и T_4 вызывают сопоставимые по величине реакции расслабления [61], тогда как в артериях тонкого кишечника крысы T_4 обладает более выраженным эффектом, чем T_3 [55]. В мелких артериях, приносящих кровь к скелетной мышце крысы, T_4 оказывает более мощное сосудорасширяющее влияние по сравнению с T_3 [72], но в артериолах скелетных мышц крысы, напротив, более выражено влияние T_3 [71]. Такая неоднозначность экспериментальных данных предполагает, что в сосудах разных органов, а также на разных участках сосудистого русла негеномные эффекты ТГ могут быть опосредованы рецепторами, различающимися по аффинности к T_3 и T_4 (цитоплазматические или мембранные рецепторы или же разные сайты связывания интегрин $\alpha v \beta 3$ (рис. 1)).

Нужно отметить, что концентрации, в которых T_4 или T_3 вызывают расширение сравнительно крупных сосудов, как правило, превышают концентрации этих гормонов в крови. Например, у крыс концентрация общего T_3 в сыворотке крови составляет несколько нМ [56], а быстрая вазодилатация наблюдается при использовании концентрации 100 нМ [63, 67, 69, 73]. Концентрация общего T_4 составляет около 100 нМ [56], а расслабление артерий крысы он вызывает в концентрации более 1 мкМ [55, 72]. Вместе с тем, для расслабления

дистальных участков сосудистого русла достаточно концентрации несколько нМ для T_3 и 150 нМ — для T_4 [65, 71], что почти не выходит за рамки физиологического диапазона. Таким образом, прямое негеномное действие ТГ на сосуды может быть одним из физиологических механизмов регуляции их тонуса и сопротивления кровотоку.

Мишенью ТГ могут являться как эндотелиальные, так и гладкомышечные клетки сосудистой стенки. В экспериментах на препаратах аорты крысы расслабление в ответ на T_3 исчезало после удаления эндотелия [63]. В опытах на артериолах скелетных мышц было обнаружено, что удаление эндотелия ослабляет, но не предотвращает вазодилатацию в ответ на T_3 , то есть гормон способен воздействовать как на эндотелий, так и на гладкую мышцу [71]. Вместе с тем в бедренных артериях была показана эндотелий-независимая природа индуцированного T_3 расслабления [69]. Расслабление артерий икроножной мышцы в ответ на T_4 также не изменялось после удаления эндотелия, то есть было обусловлено влиянием T_4 на гладкомышечные клетки [72].

Наиболее функционально значимый механизм участия эндотелия в расширении сосудов связан с продукцией им NO за счет активности eNOS [74]. В аорте крысы расслабление в ответ на T_3 исчезало как под действием ингибиторов NO-синтазы или растворимой гуанилатциклазы (основная мишень NO в гладкомышечных клетках), так и при полном удалении эндотелия [63]. В артериях тонкого кишечника и артериолах скелетных мышц крысы, где расслабление в ответ на T_3 частично зависит от эндотелия, ингибирование син-

Таблица

Механизмы негеномного влияния тиреоидных гормонов в артериях разных органов, а также в культуре гладкомышечных или эндотелиальных клеток сосудов

Объект исследования	Исследованные гормоны и сравнение их эффектов	Участие эндотелия	Механизм вазодилатации
Аорта крысы и мыши	T_3 ; T_4 не исследован	Эндотелий участвует [63]. Эндотелий не участвует [73]	Продукция NO в эндотелии [63]. Продукция NO в ГМК [73]
Коронарные сосуды крысы	$T_3 = T_4$	Не исследовано	Не связан с продукцией NO [61]
Бедренная артерия крысы	T_3 ; T_4 не исследован	Эндотелий не участвует [69]	Не исследован
Артерии скелетных мышц крысы	$T_4 > T_3$	Эндотелий не участвует	Опосредован интегрином $\alpha v \beta 3$ и не связан с продукцией NO [72]
Артериолы скелетных мышц крысы	$T_3 > T_4$	Эндотелий участвует наравне с гладкой мышцей	Связан с продукцией NO и простагличина эндотелием [71]
Артерии тонкого кишечника крысы	T_3 [69]; $T_4 > T_3$ [55]	Эндотелий не участвует [69]. Эндотелий участвует наравне с гладкой мышцей [55]	Не связан с продукцией NO [69]. Связан с продукцией NO [55]
Культура эндотелиальных клеток сосудов	T_3 [12]; $T_3 > T_4$ [77]	Эндотелий участвует	Связан с активацией сигнального пути $TR\alpha 1/PI3K/Akt$ [12, 77] и увеличением продукции NO в результате активности eNOS [12]
Культура гладкомышечных клеток сосудов	T_3 ; T_4 не исследован	Эндотелий не участвует	Не связан с продукцией NO [75]. Связан с опосредованной $PI3K/Akt$ продукцией NO в результате активности nNOS и iNOS [73]

Примечание: eNOS, nNOS и iNOS — эндотелиальная, нейрональная и индуцибельная изоформы NO-синтазы, соответственно; ГМК — гладкомышечные клетки сосудов.

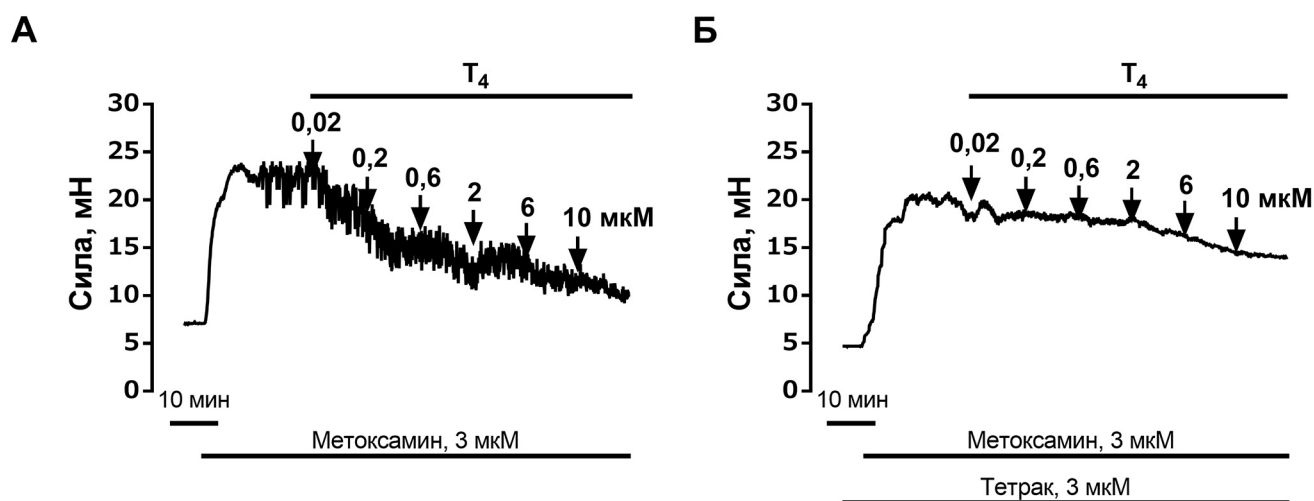


Рис. 2. Реакции артерий икроножной мышцы крысы с предварительно удаленным эндотелием на T_4 (постепенное повышение концентрации от 0,02 до 10 мкМ с 10-минутными интервалами). Добавление T_4 проводится на фоне предварительного сокращения препаратов метоксалином (агонист $\alpha 1$ -адренорецепторов). **А:** T_4 вызывает дозозависимое расслабление артерии; **Б:** Ингибитор интегрин $\alpha v \beta 3$ тетрак (3 мкМ, инкубация в течение 30 мин) значительно уменьшает реакции артерии на T_4 . Запись получена авторами обзора.

теза NO приводило к ослаблению вызванной T_3 или T_4 вазодилатации, но не подавляло ее полностью [55, 71]. Тогда как в артериях, которые расслабляются под действием ТГ независимо от эндотелия (бедренная артерия и артерии икроножной мышцы), ингибирование синтеза NO не влияло на вазодилатацию [69, 72]. Расслабление коронарных артерий в ответ на ТГ также не зависело от продукции NO [61].

ТГ могут повышать синтез NO и в гладкомышечных клетках сосудов: ингибирование синтеза NO может ослаблять релаксирующее влияние T_3 на препараты аорты с удаленным эндотелием [73]. В этой же работе было показано повышение экспрессии нейрональной и индуцибельной изоформ NO-синтазы в культуре гладкомышечных клеток аорты крысы уже после 30-минутной инкубации с T_3 [73]. Однако в экспериментах другой научной группы, также выполненных на культуре гладкомышечных клеток аорты крысы, вызванное T_3 ослабление сокращения клеток (регистрируемое по изменению натяжения подложки) не было связано с влиянием NO [75].

Посредником негеномного влияния ТГ на эндотелий является ядерный рецептор $TR\alpha 1$. Эксперименты на культуре HUVEC и аорты быка показали, что в цитоплазме клетки T_3 связывается с комплексом $TR\alpha 1$ и регуляторной субъединицы p85 PI3K, что приводит к активации PI3K и Akt, фосфорилированию eNOS и повышению ее активности [12]. Артерии мышей с нокаутом гена $TR\alpha 1$ ($TR\alpha^{0/0}$) не расслабляются в ответ на T_3 [70]. Нужно отметить, что у мышей с генотипом $TR\alpha^{0/0}$ не образуются все изоформы ядерных рецепторов $TR\alpha$, в том числе и укороченные, которые также могут опосредовать негеномные эффекты T_3 [23, 76] (рис. 1).

Увеличение уровня NO в культуре гладкомышечных клеток также может быть связано с активацией сигнального пути PI3K/Akt [73]. Вместе с тем, наши эксперименты показали, что ингибитор интегрин $\alpha v \beta 3$ тетрак подавляет вызванную T_4 вазодилатацию артерий икроножной мышцы крысы [72], оригинальная запись репрезентативного эксперимента приведена на рис. 2. Это означает, что интегрин $\alpha v \beta 3$, расположенный в гладкомышечных клетках, участвует в негеномной тиреоидной регуляции тонуса артерий скелетных мышц.

В заключение отметим, что негеномное действие ТГ — это важный аспект их регуляторного влияния в организме. Молекулярные механизмы негеномного влияния ТГ на сосудистую систему требуют дальнейшего изучения, при этом необходимо учитывать, что рецепторы и участники индуцируемых гормонами сигнальных каскадов могут различаться в сосудах разных органов или же в сосудах, расположенных на разных порядках ветвления сосудистого русла в одном органе. В том числе, разнообразие молекулярных механизмов, опосредующих негеномное действие ТГ, может объяснить неодинаковые изменения регуляции кровотока в разных органах при гипо- или гипертиреозе. Поскольку негеномное действие ТГ может быть задействовано в развитии сердечно-сосудистых патологий, связанных с нарушениями тиреоидного статуса, изучение их механизмов позволит выявить новые мишени для терапии сердечно-сосудистых расстройств, а также расширит диапазон терапевтического применения ТГ и их производных.

Обзор написан при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-315-90027). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hulbert A.J.* Thyroid hormones and their effects: a new perspective // *Biol. Rev.* 2000. Vol. 75. N 4. P. 519–631.
2. *Vasudevan N., Ogawa S., Pfaff D.* Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82. N 4. P. 923–944.
3. *Vassy R., Nicolas P., Yin Y.L., Perret G.Y.* Nongenomic effect of triiodothyronine on cell surface beta-adrenoceptors in cultured embryonic cardiac myocytes // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997. Vol. 214. N 4. P. 352–358.
4. *Hammes S.R., Davis P.J.* Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. Vol. 29. N 4. P. 581–593.
5. *Davis P.J., Davis F.B., Lin H.Y., Mousa S.A., Zhou M., Luidens M.K.* Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. Vol. 297. N 6. P. E1238–E1246.
6. *Flamant F., Cheng S., Hollenberg A., Moeller L.C., Samarut J., Wondisford F.E., Yen P.M., Refetoff S.* Thyroid hormone signaling pathways: Time for a more precise nomenclature // *Endocrinology.* 2017. Vol. 158. N 7. P. 2052–2057.
7. *Davis P.J., Leonard J.L., Lin H.Y., Leinung M., Mousa S.A.* Molecular basis of nongenomic actions of thyroid hormone // *Vitam. Horm.* 2018. Vol. 106. P. 67–96.
8. *Louzada R.A., Carvalho D.P.* Similarities and differences in the peripheral actions of thyroid hormones and their metabolites // *Front. Endocrinol.* 2018. Vol. 9: 394
9. *Schroeder A., Jimenez R., Young B., Privalsky M.L.* The ability of thyroid hormone receptors to sense T4 as an agonist depends on receptor isoform and on cellular cofactors // *Mol. Endocrinol.* 2014. Vol. 28. N 5. P. 745–757.
10. *Cao X., Kambe F., Moeller L.C., Refetoff S., Seo H.* Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts // *Mol. Endocrinol.* 2005. Vol. 19. N 1. P. 102–112.
11. *Moeller L.C., Dumitrescu A.M., Refetoff S.* Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolytic genes // *Mol. Endocrinol.* 2005. Vol. 19. N 12. P. 2955–2963.
12. *Hiroi Y., Kim H.H., Ying H., Furuya F., Huang Z., Simoncini T., Noma K., Ueki K., Nguyen N., Scanlan T.S., Moskowitz M.A., Cheng S.Y., Liao J.K.* Rapid nongenomic actions of thyroid hormone // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103. N 38. P. 14104–14109.
13. *Plateroti M., Gauthier K., Domon-Dell C., Freund J., Samarut J., Chassande O.* Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TR α) and natural truncated TR Δ isoforms in the control of intestine development // *Mol. Cell. Biol.* 2001. Vol. 21. N 14. P. 4761–4772.
14. *Chassande O., Fraichard A., Gauthier K., Flamant F., Legrand C., Savatier P., Laudet V., Samarut J.* Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA α locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor- α and triiodothyronine receptor activities // *Mol. Endocrinol.* 1997. Vol. 11. N 9. P. 1278–1290.
15. *Siegrist-Kaiser C.A., Juge-Aubry C., Tranter M.P., Ekenbarger D.M., Leonard J.L.* Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. N 9. P. 5296–5302.
16. *Davis P.J., Leonard J.L., Davis F.B.* Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone // *Front. Neuroendocrinol.* 2008. Vol. 29. N 2. P. 211–218.
17. *Cheng S.Y., Leonard J.L., Davis P.J.* Molecular aspects of thyroid hormone actions // *Endocr. Rev.* 2010. Vol. 31. N 2. P. 139–170.
18. *Lanni A., Moreno M., Goglia F.* Mitochondrial actions of thyroid hormone // *Compr. Physiol.* 2016. Vol. 6. N 4. P. 1591–1607.
19. *Wrutniak C., Cassar-Malek I., Marchal S., Rasche A., Heusser S., Keller J., Flechon J., Dauca M., Samarut J., Ghysdael J., Cabello G.* A 43-kDa protein related to c-Erb A α 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. N 27. P. 16347–16354.
20. *Pessemesse L., Lepourry L., Bouton K., Levin J., Cabello G., Wrutniak-Cabello C., Casas F.* P28, a truncated form of TR α 1 regulates mitochondrial physiology // *FEBS Lett.* 2014. Vol. 588. N 21. P. 4037–4043.
21. *Botta J., Mendoza D., Morero R.D., Farias R.N.* High affinity L-triiodothyronine binding sites on washed rat erythrocyte membranes // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. N 11. P. 6690–6692.
22. *Lin H.Y., Davis F.B., Gordinier J.K., Martion L.J., Davis P.J.* Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1999. Vol. 276. N 5. P. C1014–C1024.
23. *Kalyanaraman H., Schwappacher R., Joshua J., Zhuang S., Scott B.T., Klos M., Casteel D.E., Frangos J.A., Dillmann W., Boss G.R., Pilz R.B.* Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor // *Sci. Signal.* 2014. Vol. 7. N 326: ra48.
24. *Bergh J.J., Lin H., Lansing L., Mohamed S.N., Davis F.B., Mousa S., Davis P.J.* Integrin $\alpha_v\beta_3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis // *Endocrinology.* 2005. Vol. 146. N 7. P. 2864–2871.
25. *LaFoya B., Munroe J.A., Miyamoto A., Detweiler M.A., Crow J.J., Gazdik T., Albright A.R.* Beyond the matrix: The many non-ECM ligands for integrins // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. N 2: 449.
26. *Hynes R.O.* Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion // *Cell.* 1992. Vol. 69. N 1. P. 11–25.
27. *Xiong J.-P., Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman S.L., Arnaout M.A.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand // *Science.* 2002. Vol. 296. N 5565. P. 151–155.

28. Freindorf M., Furlani T.R., Kong J., Cody V., Davis F.B., Davis P.J. Combined QM/MM study of thyroid and steroid hormone analogue interactions with integrin // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. Vol. 2012: 959057.
29. Lin H.Y., Sun M., Tang H., Lin C., Luidens M.K., Mousa S.A., Incerpi S., Drusano G.L., Davis F.B., Davis P.J. L-thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: Activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009. Vol. 296. N 5. P. C980–C991.
30. Uzair I.D., Grand J.C., Flamini M.I., Sanchez A.M. Molecular actions of thyroid hormone on breast cancer cell migration and invasion via contactin/N-WASP // *Front. Endocrinol.* 2019. Vol. 10: 139.
31. Davis P.J., Shih A., Lin H., Martino L.J., Davis F.B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. N 48. P. 38032–38039.
32. Cao H.J., Lin H., Luidens M.K., Davis F.B., Davis P.J. Cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptor- β 1 (Tr β 1) is directed from a plasma membrane integrin receptor by thyroid hormone // *Endocr. Res.* 2009. Vol. 34. N 1–2. P. 31–42.
33. Lin H., Shih A., Davis F.B., Davis P.J. Thyroid hormone promotes the phosphorylation of STAT3 and potentiates the action of epidermal growth factor in cultured cells // *Biochemistry.* 1999. Vol. 338. N 2. P. 427–432.
34. Liu X., Zheng N., Shi Y., Yuan J., Lanying L. Thyroid hormone induced angiogenesis through the integrin $\alpha\beta$ 3/protein kinase D/histone deacetylase 5 signaling pathway // *J. Mol. Endocrinol.* 2014. Vol. 52. N 3. P. 245–254.
35. Lei J., Ingbar D.H. Src kinase integrates PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 pathways in T3-induced Na-K-ATPase activity in adult rat alveolar cells // *Am. J. Physiol. Cell Mol. Physiol.* 2011. Vol. 301. N 5. P. L765–L771.
36. Axelband F., Dias J., Ferrão F.M., Einicker-Lamas M. Nongenomic signaling pathways triggered by thyroid hormones and their metabolite 3-iodothyronamine on the cardiovascular system // *J. Cell. Physiol.* 2010. Vol. 226. N 1. P. 21–28.
37. Farwell A.P., Dubord-Tomasetti S.A., Pietrzykowski A.Z., Stachelek S.J., Leonard J.L. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine // *Dev. Brain Res.* 2005. Vol. 154. N 1. P. 121–135.
38. Lin H., Su Y., Hsieh M., Lin S., Meng R., London D., Lin C., Tang H., Hwang J., Davis F.B., Mousa S.A., Davis P.J. Nuclear monomeric integrin α in cancer cells is a coactivator regulated by thyroid hormone // *FASEB J.* 2013. Vol. 27. N 8. P. 3209–3216.
39. Oliveira M., Olimpio R.M.C., Sibio M.T., Moretto F.C.F., Luvizotto R.A.M., Nogueira C.R. Short-term effects of triiodothyronine on thyroid hormone receptor alpha by PI3K pathway in adipocytes, 3T3-L1 // *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2014. Vol. 58. N 8. P. 833–837.
40. Lin H.-Y., Hopkins R., Cao H.J., Tang H., Alexander C., Davis F.B., Davis P.J. Acetylation of nuclear hormone receptor superfamily members: thyroid hormone causes acetylation of its own receptor by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism // *Steroids.* 2005. Vol. 70. N 5–7. P. 444–449.
41. Sánchez-Pacheco A., Martínez-Iglesias O., Méndez-Pertuz M., Aranda A. Residues K128, 132, and 134 in the thyroid hormone receptor- α are essential for receptor acetylation and activity // *Endocrinology.* 2009. Vol. 150. N 11. P. 5143–5152.
42. Scapin S., Leoni S., Spagnuolo S., Gnocchi D., De Vito P., Luly P., Pedersen J.Z., Incerpi S. Short-term effects of thyroid hormones during development: Focus on signal transduction // *Steroids.* 2010. Vol. 75. N 8–9. P. 576–584.
43. Danzi S., Klein I. Thyroid disease and the cardiovascular system // *Endocrinol. Metab. Clin.* 2014. Vol. 43. N 2. P. 517–528.
44. Vargas F., Moreno J.M., Rodríguez-Gómez I., Wangenstein R., Osuna A., Alvarez-Guerra M., Garcis-Están J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders // *Eur. J. Endocrinol.* 2006. Vol. 154. N 2. P. 197–212.
45. Heron M.I., Rakusan K. Short- and long-term effects of neonatal hypo- and hyperthyroidism on coronary arterioles in rat // *Am. J. Physiol.* 1996. Vol. 271. N 5. P. H1746–H1754.
46. Rodríguez-Gómez I., Banegas I., Wangenstein R., Quesada A., Jiménez R., Gómez-Morales M., Francisco O'Valle, Duarte J., Vargas F. Influence of thyroid state on cardiac and renal capillary density and glomerular morphology in rats // *J. Endocrinol.* 2013. Vol. 216. N 1. P. 43–51.
47. Селиванова Е.К., Тарасова О.С. Программирующее влияние тиреоидных гормонов на сердечно-сосудистую систему // *Валеология.* 2016. № 4. С. 60–67.
48. Тарасова О.С., Софронова С.И., Гайнуллина Д.Г., Борзых А.А., Мартынов А.А. Регуляция продукции оксида азота эндотелием сосудов при физической нагрузке: роль тиреоидных гормонов // *Авиакосм. эколог. мед.* 2015. Т. 49. № 2. С. 55–62.
49. McAllister R.M., Grossenburg V. D., Delp M.D., Laughlin M.H. Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1998. Vol. 274. N 5. P. E946–E953.
50. Khorshidi-Behzadi M., Alimoradi H., Haghjoo-Javanmard S., Sharifi M.R., Rahimi N., Dehpour A.R. The effect of chronic hyperthyroidism and restored euthyroid state by methimazole therapy in rat small mesenteric arteries // *Eur. J. Pharmacol.* 2013. Vol. 701. N 1–3. P. 20–26.
51. Honda H., Iwata T., Mochizuki T., Kogo H. Changes in vascular reactivity induced by acute hyperthyroidism in isolated rat aortae // *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 2000. Vol. 34. N 6. P. 429–434.
52. Deng J., Zhao R., Zhang Z., Wang J. Changes in vasoreactivity of rat large- and medium-sized arteries induced by hyperthyroidism // *Exp. Toxicol. Pathol.* 2010. Vol. 62. N 3. P. 317–322.
53. Гайнуллина Д.К., Селиванова Е.К., Шарова А.П., Тарасова О.С. Повышение констрикторного влияния

Rho-киназы в артериях скелетных мышц и сердца при хроническом гипотиреозе у крыс // Бюлл. сиб. мед. 2018. Т. 17. № 4. С. 23–32.

54. Iwata T., Honda H. Acute hyperthyroidism alters adrenoceptor- and muscarinic receptor-mediated responses in isolated rat renal and femoral arteries // Eur. J. Pharmacol. 2004. Vol. 493. N 1–3. P. 191–199.

55. Zwaveling J., Pfaffendorf M., van Zwieten P.A. The direct effects of thyroid hormones on rat mesenteric resistance arteries // Fundam. Clin. Pharmacol. 1997. Vol. 11. N 1. P. 41–46.

56. Gaynullina D.K., Sofronova S.I., Selivanova E.K., Shvetsova A.A., Borzykh A.A., Sharova A.P., Kostyunina D.S., Martyanov A.A., Tarasova O.S. NO-mediated anticontractile effect of the endothelium is abolished in coronary arteries of adult rats with antenatal/early postnatal hypothyroidism // Nitric Oxide. 2017. Vol. 63. P. 21–28.

57. Luidens M.K., Mousa S.A., Davis F.B., Lin H.Y., Davis P.J. Thyroid hormone and angiogenesis // Vasc. Pharmacol. 2010. Vol. 52. N 3–4. P. 142–145.

58. Yoshida T., Gong J., Xu Z., Wei Y., Duh E.J. Inhibition of pathological retinal angiogenesis by the integrin $\alpha\beta 3$ antagonist tetraiodothyroacetic acid (tetrac) // Exp. Eye Res. 2012. Vol. 94. N 1. P. 41–48.

59. Mousa S.A., Bergh J.J., Dier E., Rebbaa A., O'Connor L.J., Yalcin M., Aljada A., Dyskin E., Davis F.B., Lin H., Davis P.J. Tetraiodothyroacetic acid, a small molecule integrin ligand, blocks angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor // Angiogenesis. 2008. Vol. 11. N 2. P. 183–190.

60. Millard M., Odde S., Neamati N. Integrin targeted therapeutics // Theranostics. 2012. Vol. 1. P. 154–188.

61. Yoneda K., Takasu N., Higa S., Oshiro C., Oshiro Y., Shimabukuro M., Asahi T. Direct effects of thyroid hormones on rat coronary artery: nongenomic effects of triiodothyronine and thyroxine // Thyroid. 1998. Vol. 8. N 7. P. 609–613.

62. Barreto-Chaves M.L., De Souza Monteiro P., Fürstenau C.R. Acute actions of thyroid hormone on blood vessel biochemistry and physiology // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 2011. Vol. 18. N 5. P. 300–303.

63. Lozano-Cuenca J., Lopez-Canales O.A., Aguilar-Carrasco J.C., Villagrana-Zesati J.R., Lopez-Mayorga R.M., Castillo-Henkel E.F., Lopez-Canales J.S. Pharmacological study of the mechanisms involved in the vasodilator effect produced by the acute application of triiodothyronine to rat aortic rings // Brazilian J. Med. Biol. Res. 2016. Vol. 49. N 8. P. 1–9.

64. Gachkar S., Nock S., Geissler C., Oelkrug R., Johann K., Resch J., Rahman A., Arner A., Kirchner H., Mittag J. Aortic effects of thyroid hormone in male mice // J. Mol. Endocrinol. 2019. Vol. 62. N 3. P. 91–99.

65. Colantuoni A., Marchiafava P.L., Lapi D., Forini F.S., Iervasi G. Effects of tetraiodothyronine and triiodothyronine on hamster cheek pouch microcirculation // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005. Vol. 288. N 4. P. H1931–H1936.

66. Kimura K., Shirozaki Y., Jujo S., Shizuma T., Fukuyama N., Nakazawa H. Triiodothyronine acutely increases blood flow in the ventricles and kidneys of anesthetized rabbits // Thyroid. 2006. Vol. 16. N 4. P. 357–360.

67. Krasner J.L., Wendling W.W., Cooper S.C., Chen D., Hellman S.K., Eldridge C.J., McClurken J.B., Jeevanandam V., Carlsson C. Direct effects of triiodothyronine on human internal mammary artery and saphenous veins // J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. 1997. Vol. 11. N 4. P. 463–466.

68. Schmidt B.M.W., Martin N., Georgens A.C., Tillman H., Feuring M., Christ M., Wehling M. Nongenomic cardiovascular effects of triiodothyronine in euthyroid male volunteers // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002. Vol. 87. N 4. P. 1681–1686.

69. Cai Y., Manio M.M., Leung G.P.H., Xu A., Tang E.H.C., Vanhoutte P.M. Thyroid hormone affects both endothelial and vascular smooth muscle cells in rat arteries // Eur. J. Pharmacol. 2015. Vol. 747. P. 18–28.

70. Liu K.L., Lo M., Canaple L., Gauthier K., Carmine P., Beylot M. Vascular function of the mesenteric artery isolated from thyroid hormone receptor- α knockout mice // J. Vasc. Res. 2014. Vol. 51. N 5. P. 350–359.

71. Park K.W., Dai H.B., Ojamaa K., Lowenstein E., Klein I., Sellke F.W. The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistance arteries // Anesth. Analg. 1997. Vol. 85. N 4. P. 734–738.

72. Selivanova E., Gaynullina D., Tarasova O. Endothelium and Rho-kinase are not essential for nongenomic relaxatory effects of thyroxine in rat skeletal muscle arteries // Acta Physiol. (Oxf.). 2019. Vol. 227. N S721. P. 119.

73. Carrillo-Sepulveda M.A., Ceravolo G.S., Fortes Z.B., Carvalho M.H., Tostes R.C., Laurindo F.R., Webb R.C., Barreto-Chaves M.L.M. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes // Cardiovasc. Res. 2010. Vol. 85. N 3. P. 560–570.

74. Гайнулина Д.К., Кирюхина О.О., Тарасова О.С. Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия // Усп. физиол. наук. 2013. Т. 44. № 4. С. 88–102.

75. Ojamaa K., Klemperer J.D., Klein I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle // Thyroid. 1996. Vol. 6. N 5. P. 505–512.

76. Flamant F., Samarut J. Thyroid hormone receptors: Lessons from knockout and knock-in mutant mice // Trends Endocrinol. Metab. 2003. Vol. 14. N 2. P. 85–90.

77. Aoki T., Tsunekawa K., Araki O., Ogiwara T., Nara M., Sumino H., Kimura T., Murakami M. Type 2 iodothyronine deiodinase activity is required for rapid stimulation of PI3K by thyroxine in human umbilical vein endothelial cells // Endocrinology. 2015. Vol. 156. N 11. P. 4312–4324.

Поступила в редакцию 17.08.2020 г.

После доработки 05.10.2020 г.

Принята в печать 12.10.2020 г.

REVIEW

Nongenomic effects of thyroid hormones: role in regulation of the vascular system

E.K. Selivanova^{1,*} , O.S. Tarasova^{1,2} 

¹*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*Laboratory of Exercise Physiology, Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoye shosse 76A, Moscow, 123007, Russia*

*e-mail: selivanova@mail.bio.msu.ru

The nongenomic effects of thyroid hormones develop within minutes or hours and do not depend on the binding of the hormone to the transcriptionally active nuclear receptors TR α and TR β . These effects are characterized by a variety of receptors and signaling pathways involved, which may be distinct in different cell types. T₃ or T₄ can induce nongenomic effect by association with transcriptionally inactive TR α and TR β in the cytoplasm of the cell, their truncated isoforms or integrin $\alpha\text{v}\beta 3$. With nongenomic action, as well as with genomic action, T₃ and T₄ can alter gene transcription, but in this case, their influence is extended to wider spectrum of genes. The nongenomic effects of thyroid hormones often complement the genomic ones, causing similar changes in cell activity, or enhance them by providing TR α and TR β translocation into the nucleus or their post-translational modification. The nongenomic effects of thyroid hormones on the vasculature include angiogenesis and rapid vasodilation. The key signaling cascade mediating angiogenesis includes integrin $\alpha\text{v}\beta 3$, protein kinase D, and histone deacetylase 5. The mechanisms of rapid vasodilation are still poorly understood and may vary in different regions of the vascular bed. In cytoplasm of endothelial cells, the nongenomic effect of thyroid hormones is mediated by TR $\alpha 1$, PI3K, and NO synthase, but this mechanism is not universal. Thyroid hormones-induced vasodilation of skeletal muscle arteries includes the participation of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin located in smooth muscle cells, but the signaling cascades triggered by it have not yet been studied. Knowledge of the molecular mechanisms of the nongenomic effect of thyroid hormones is important for the development of new methods of pharmacological correction of vascular pathologies, which are usually associated with thyroid disorders.

Keywords: *thyroid hormones, nongenomic effects, angiogenesis, vascular tone, tetrac, integrin $\alpha\text{v}\beta 3$*

Сведения об авторах

Селиванова Екатерина Константиновна — аспирант, мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: selivanova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2732-3726>

Тарасова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, вед. науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ost.msu@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4230-3849>

ОБЗОР

УДК 57.017.6+576.53+57.022

Клетки китайского хомячка в биотехнологических и геронтологических исследованиях

Г.В. Моргунова 

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

Одним из наиболее часто используемых в геронтологии модельных объектов являются дрожжи, в первую очередь — *Saccharomyces cerevisiae*. Накоплено значительное количество данных, позволяющих считать, что в претерпевающих хронологическое, или «стационарное», старение дрожжах возникают нарушения, сходные с возрастными нарушениями в клетках многоклеточного организма. Однако дрожжи, как и любые объекты исследований, не лишены недостатков — в частности, они, хотя и являются эукариотами, в эволюционном плане отстоят далеко от млекопитающих, что накладывает ограничение на изучение у дрожжей неконсервативных метаболических путей. В некоторых случаях в экспериментах с хронологической моделью лучше использовать клетки млекопитающих — например, клетки китайского хомячка. Они широко используются в промышленности для получения моноклональных антител и рекомбинантных белков. Значительная доля этих продуктов образуется после остановки пролиферации, которая инициирует хронологическое старение культуры. Накопленные данные об особенностях метаболизма клеток, роста культуры и продолжительности ее функциональной жизни являются крайне ценными для геронтологов. Обмен информацией между двумя этими направлениями — биотехнологическим и геронтологическим — будет полезен обоим сторонам.

Ключевые слова: клеточное старение, клеточные культуры, «стационарное старение», хронологическое старение, метаболизм, лактат, эффект Варбурга

На протяжении всей истории экспериментальной геронтологии (как и любого другого раздела экспериментальной биологии) предпринимаются попытки дополнить ряд модельных объектов новыми. Некоторые из таких объектов становятся классическими (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* и др.), другие не приобретают такую же популярность (*Ceratitis capitata*, *Monochamus alternatus*, *Peromyscus leucopus*). Дрожжи, и в первую очередь *Saccharomyces cerevisiae*, входят в число «любимчиков» у геронтологов — количество публикаций о старении дрожжей с конца 90-х гг. выросло в 5–6 раз (если судить по PubMed). Для этого объекта разработаны даже два варианта «состаривания» — хронологическое и репликативное [1, 2]. Каждая из моделей служит своим целям: репликативная модель может помочь в изучении старения активно делящихся клеток организма [3], хронологическая — в изучении старения непродлиферирующих или медленно пролиферирующих клеток [4, 5]. Обе модели важны для исследований, посвященных феномену старения клеток стволовой ниши [3].

Дрожжи являются одноклеточными организмами, к тому же эукариотическими, поэтому они считаются одними из лучших объектов для изуче-

ния старения на клеточном уровне. Однако, как и любые экспериментальные объекты, они не лишены своих недостатков. На молекулярном уровне дрожжи в той или иной мере отличаются от млекопитающих [6–8]. Например, один из ключевых регуляторов метаболизма, представляющий значительный интерес для геронтологов, АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК; AMP-activated protein kinase) у дрожжей представлена ортологом — SNF1 (от sucrose-nonfermenting), который отличается не только в структурном плане, но и по своей регуляции — в частности, его активацию вызывает повышенный уровень АДФ, а не АМФ [9]. Подобных отличий много, так как в эволюционном плане млекопитающие далеко ушли от одноклеточных (у дрожжей примерно в 5 раз меньше генов, чем у человека). Так как многие связанные со старением процессы являются эволюционно консервативными метаболическими путями, эксперименты с *S. cerevisiae* будут давать результаты, но не всегда исследователей интересуют только эти пути. Немаловажным моментом является то, что у дрожжей есть клеточная стенка, которая потенциально может помешать проникновению тех или иных лекарственных средств в клетку [10]. В связи с этим ка-

жется целесообразным проводить геронтологические опыты не только на дрожжах, но и на культурах клеток млекопитающих.

Довольно много исследований в этом направлении провели биотехнологи, работающие с клетками млекопитающих для получения моноклональных антител и рекомбинантных белков. В их опытах клеточные культуры претерпевают хронологическое (или «стационарное», если мы говорим о клетках млекопитающих) старение. На данный момент в этой области накоплен обширный материал. Используемые линии клеток являются «бессмертными», однако получать продукты от одной культуры, даже если производить подачу свежей питательной среды и удаление старой, можно лишь в течение ограниченного периода времени [11], так как для этих культур также существует понятие «продолжительность жизни» [12]. Рост культур и продолжительность их жизни могут ограничивать продукты метаболизма (даже при условии проточного культивирования), повышенная осмолярность среды (которая возникает как вследствие накопления продуктов распада, так и из-за вмешательства исследователей в поддержание pH) и т.д. Однако ни при одном из известных способов производства белков и антител не удается получать продукты бесконечно, поэтому продление срока функционирования клеток является первоочередной задачей для биотехнологов.

Клетки китайского хомячка в биотехнологических исследованиях

Наиболее часто используемыми в этой отрасли являются клетки китайского хомячка (чаще клетки яичника китайского хомячка; СНО — Chinese hamster ovary cells). Клетки хомячка удобны вследствие их способности расти на средах, не требующих добавки сыворотки, малого числа хромосом, меньшего риска заражения вирусами человека и т.д. [13–18]. Кроме того, посттрансляционные модификации рекомбинантных белков в СНО совместимы с модификациями у человека [19]. В ходе биотехнологических опытов на этой линии клеток установлено множество интересных закономерностей — изучена динамика поглощения глюкозы клетками и кинетика выделения ими продуктов распада, исследован характер роста таких культур на разных по составу средах [20–24], проведены генетические манипуляции, направленные на искусственное ингибирование/активацию некоторых ключевых ферментов, участвующих в метаболизме глюкозы и аминокислот [25–27]. Исследователи, работающие над производством белков, активно внедряют в практику геронтологические открытия — например, используют при культивировании рапамицин [28], стимулируют аутофагию [29] или вызывают аминокислотную депривацию [30]. Возможно, настало

время геронтологам обратиться к исследованиям биотехнологов.

Основная цель, стоящая перед биотехнологами — получить больше продукта в ходе культивирования как за счет высокого титра антител (или других белков), так и за счет долговечности культуры. Одна из проблем, возникающая при таком производстве, появляется, когда в среде начинают накапливаться продукты распада. Среди основных продуктов распада, которые могут влиять на выживаемость клеток, выделяют лактат (продукт метаболизма глюкозы) и аммиак (продукт распада глутамина) [20, 31]. Аммиак возникает в ходе метаболизма и других аминокислот, но так как содержание глутамина в среде значительно превышает содержание остальных аминокислот, то наибольший вклад вносит именно разложение глутамина [32]. Манипуляции с составом сред (например, замена глюкозы на галактозу, а глутамина на глутамат) продлевают существование непересеваемой культуры клеток СНО [20, 33], однако при этом наблюдается не такой интенсивный рост, а, следовательно, и более низкая продуктивность. В одной из работ было установлено [34], что более токсичным продуктом является лактат, а не аммиак. Авторы исследования установили, что аммоний в высоких концентрациях не препятствует росту и продуктивности клеток, а также потреблению глюкозы и глутамина, в то время как лактат в высоких концентрациях затормаживает рост на 25%, но за счет повышения осмолярности немного улучшает продуктивность клеток (это известный факт — повышение осмолярности усиливает производство белков и антител клетками китайского хомячка [35–38]). С другой стороны, лактат не является конечным продуктом метаболизма глюкозы, поэтому силы многих исследователей направлены на поиск способов, которые могли бы заставить клетки потреблять лактат и метаболизировать его в цикле трикарбоновых кислот (рисунок).

Лактат: ядовитый метаболит или источник углерода

Лактат быстро накапливается в стадии активного роста культуры при промышленном культивировании клеток млекопитающих. Одной из причин его накопления является эффект Варбурга [39], или анаэробный гликолиз. О. Варбург обнаружил, что асцитные раковые клетки потребляют очень много глюкозы и используют гликолиз для получения энергии, несмотря на наличие кислорода [40]. Важно, что при этом они производят столько же энергии в ходе гликолитической ферментации, сколько производили бы при окислительном фосфорилировании за ту же единицу времени [41]. Аэробный гликолиз помогает пролиферирующим клеткам быстро интегрировать питательные вещества из среды, включать их в анаболические процессы, необходимые для ро-

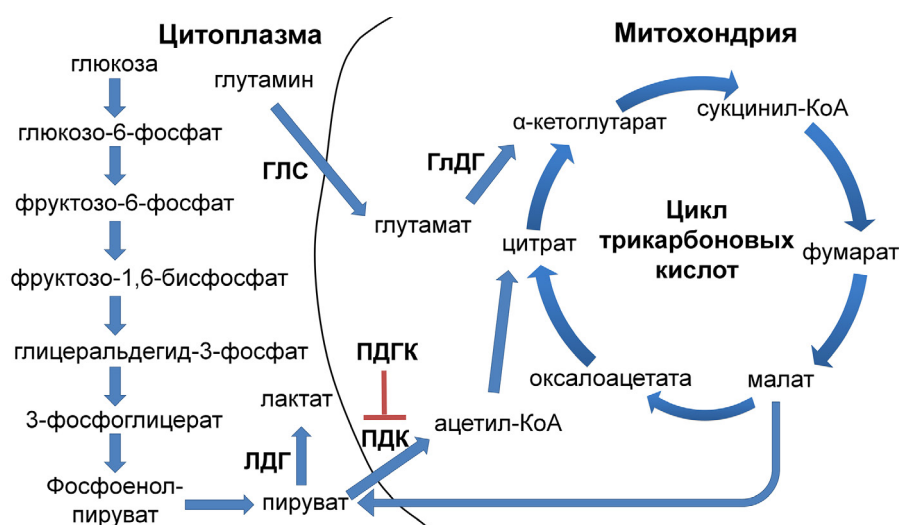


Рисунок. Катаболизм глюкозы и глутамина в клетке.

ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ПДК — пируватдегидрогеназный комплекс, ПДГК — киназа пируватдегидрогеназы, ГЛС — глутаминаза, ГлДГ — глутаматдегидрогеназа.

ста клеточной биомассы, и компенсировать снижение производства АТФ за счет быстрого потребления глюкозы [42, 43]. Другим источником лактата является глутаминализ — еще один способ активного потребления и неполного разложения, но в данном случае уже не глюкозы, а глутамин. В укороченном цикле окисления глутамин превращается в яблочную кислоту, которая затем превращается в пируват и уже в цитозоле — в лактат [44]. За счет глутаминализа клетки получают необходимый для анаболических процессов НАДФН [45]. Переход культуры из экспоненциальной фазы роста в стационарную происходит, вероятно, из-за переключения с аэробного гликолиза и глутаминализа на окислительное фосфорилирование (фазу потребления лактата) [23, 46]. Это похоже на то, что наблюдается у дрожжей: в присутствии глюкозы они предпочитают бескислородный способ образования АТФ и метаболизируют моносахарид через пируват до этанола и ацетата, а когда уровень глюкозы падает, дрожжи начинают использовать этанол и ацетат в качестве альтернативных источников углерода [47, 48].

Окислительное фосфорилирование подразумевает более эффективный с энергетической точки зрения обмен веществ, так как в этом случае углеродные субстраты окисляются до углекислого газа через цикл Кребса, поэтому усилия специалистов-биотехнологов направлены на поиск способов, заставляющих клетки использовать питательные вещества из культуральной среды максимально эффективно. Помимо упомянутого выше способа замены глюкозы и глутамин в среде на галактозу и глутамат существует и ряд других мер. Для того чтобы метаболизм глюкозы шел через цикл трикарбоновых кислот, в клетке должен активно работать пируватдегидрогеназный комплекс, который превращает пируват в ацетил-

коэнзим А (ацетил-КоА). Активность этого комплекса тормозит фермент киназа пируватдегидрогеназы. Подавление этой киназы может значительно снизить накопление лактата и увеличить производство антител, не влияя при этом на рост культуры и качество продукта [25, 49]. Можно также создавать линии СНО, экспрессирующие цитозольную пируваткарбоксилазу 2 (PCC2; pyruvate carboxylase 2) дрожжей. Экспрессия PCC2 в клетках СНО увеличивает продолжительность жизни культуры и снижает производство лактата [23, 50]. Кроме того, можно подавлять активность лактатдегидрогеназы. Частичное подавление гена лактатдегидрогеназы А (LDHA) с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) или малых РНК, образующих шпильки (shRNA), в клетках СНО снижает выработку лактата и потребление глюкозы [12, 21, 25, 27]. Полный нокаут гена лактатдегидрогеназы А (LDHA) в клетках СНО оказывается летальным [26].

Сокращение производства лактата клетками, вероятно, не так перспективно, как смещение метаболизма СНО на его потребление. При повышенном парциальном давлении CO_2 ($p\text{CO}_2$) не происходит метаболического сдвига в сторону потребления лактата [24], поэтому эффективным оказывается добавление экзогенного лактата СНО при пониженном $p\text{CO}_2$ [22]. Другая причина, по которой не может произойти сдвиг — снижение мембранного потенциала митохондрий [45]. В упомянутых выше экспериментах с заменой элементов среды также обнаружены некоторые особенности метаболизма лактата. В исследовании Альтамирано и соавт. [51] при культивировании клеток китайского хомячка на средах, содержащих глюкозу в концентрации не 20 мМ (как это обычно принято), а в 4 раза меньшей, рост культуры довольно быстро останавливался. Если же в среде содержа-

лась глюкоза в концентрации 5 мМ и галактоза в концентрации 20 мМ, то наблюдался хороший рост культуры (сопоставимый с ростом на глюкозе в концентрации 20 мМ), но при этом после истощения глюкозы клетки начинали потреблять галактозу и лактат. В подробном исследовании Вилкенс и соавт. [32] было протестировано еще больше вариантов добавки глюкозы и галактозы в разных пропорциях. Подтвердились описанные выше результаты, и, кроме того, было выдвинуто предположение, что использование лактата в качестве источника углерода становится возможным, потому что содержание глюкозы в среде уменьшается, а галактоза потребляется медленно (пропускная способность переносчиков глюкозы выше, чем переносчиков галактозы). Того количества галактозы, которое попадает в клетку, недостаточно для поддержания жизнеспособности, поэтому культура начинает потреблять лактат. Если на этапе, когда клетки использовали глюкозу, они выделяли лактат в среду, за счет чего рН среды снижался, то после истощения глюкозы клетки начинают использовать сначала внутриклеточный, а затем внеклеточный лактат, что приводит к повышению рН среды. Таким образом, потребление лактата выгодно и в плане энергетики клетки, и в плане кислотно-щелочного баланса.

Долгое время считалось, что и в организме лактат — лишь метаболический отход, притом вредным. Однако в конце XX в. отношение к нему изменилось, так как стало понятно, что он является важным посредником во многих метаболических процессах, в том числе субстратом для аэробного метаболизма [52]. Лактат обладает нейропротекторным действием, даже более того — мозг предпочитает его глюкозе [53, 54]. В самых разных тканях существует так называемый «лактатный челнок», который играет важную роль в метаболических взаимодействиях между клетками. Например, такое взаимодействие существует между глией и нейронами — астроциты передают лактат нейронам, которые метаболизируют его через цикл трикарбоновых кислот [55]. Кроме того, лактат больше не считается причиной мышечной усталости, зато он, вероятно, играет важную роль в заживлении ран [52]. Накопление лактата в тканях коррелирует с возникновением некоторых нарушений, но неверно считать накопление этого метаболита причиной возникновения таких нарушений.

Перспективы использования клеток китайского хомяка в геронтологии

Описанные метаболические особенности клеток китайского хомячка крайне ценны для геронтологии. Представляются перспективными исследования, в которых рост культуры и потребление питательных веществ будут изучены вместе с активностью метаболических регуляторов — таких, как TOR (target of rapamycin) и AMPK. Активная

пролиферация культуры не всегда означает, что в итоге будет получен большой объем продукта, так как важно еще и то, сколько времени просуществуют клетки после остановки пролиферации. Опыты с заменой части глюкозы на галактозу подтверждают это [51]. Продуктивность клеток китайского хомячка является хорошим показателем не только жизнеспособности, но и функциональной активности культуры. Очевидно, что производящие антитела или другие продукты клетки не находятся в «спящем» состоянии, вызванном нехваткой питательных веществ или отравлением метаболитами.

Дрожжи также используют в промышленных целях, и заинтересованные в высокой продуктивности исследователи пытаются найти способы продления их жизни. Например, при производстве вина дрожжи (чаще всего *S. cerevisiae*) претерпевают хронологическое старение, так как большую часть времени находятся в неделящемся состоянии. Установлены разные причины, вызывающие преждевременную гибель дрожжей, и способы продления их существования [56, 57]. Например, оказалось, что полифенол ресвератрол (антиоксидант и миметик ограничения питания) отрицательно влияет на продолжительность жизни дрожжей, как и добавка смеси витаминов [56]. Положительно влияет снижение концентрации этанола, при этом добавление небольшого его количества, в среду, в которой он предварительно был выпарен, не сокращает продолжительность жизни культуры и даже способствует достижению чуть более высокой плотности. Таким образом, преждевременное вымирание дрожжей после достижения стационарной фазы связано с накоплением избыточного количества продуктов неполного метаболизма глюкозы. Если же количество таких метаболитов не является избыточным, то клетки могут адаптироваться к новым условиям (переходят на новый этап их жизни). Нет оснований считать, что они запрограммированы на обязательную гибель по окончании ферментации [56]. Более того, наблюдается более интенсивный рост свежей культуры дрожжей в присутствии ацетата и лактата [58].

При производстве антител и белков выгоднее использовать суспензионные культуры клеток китайского хомячка (еще одно их преимущество), но существуют клетки млекопитающих, которые могут существовать только на субстрате. Способ культивации не столь важен для геронтологических экспериментов, в своих опытах мы используем именно адгезивные культуры клеток китайского хомячка [59, 60, 61].

Метаболизм глюкозы является одной из центральных тем в геронтологии. Именно с нарушением чувствительности к глюкозе связано развитие диабета второго типа, ожирения и других возрастных заболеваний. Некоторые из таких нарушений могут проявляться уже на клеточном уровне. Кроме того, важным является изучение

эффекта Варбурга, так как неконтролируемый рост опухолей осуществляется с его помощью [40]. Поиск способов, предотвращающих аэробный гликолиз, может оказаться полезным и для онкологии. Не менее важно изучение метаболизма глутамина — например, ингибирование глутаминаз является одним из способов метаболической терапии опухолей [62].

Возможно, разработанный нами для оценки геропротекторных свойств метод построения кривых выживания и расчета показателей продолжительности жизни [63] окажется полезным и для биотехнологов, так как с помощью этого подхода можно будет оценивать условия культивирования («благополучие» культуры) — чем идеальнее подобраны условия, тем более ректангуляризованной получится кривая выживания культуры клеток.

В целом, изучение «стационарного», или хронологического, старения по-прежнему остается

перспективным. Более того, появляются работы с новыми интересными вариантами установок для проведения опытов. Например, в исследовании «стационарного» старения бактерий была разработана установка для проточного культивирования *Escherichia coli* [64], не позволяющая бактериям делиться (так как в каждой лунке этой установки может поместиться лишь одна бактерия). Создание новых технологических решений поможет устранить существующие недостатки модели «стационарного» старения и, возможно, усовершенствовать процесс получения рекомбинантных белков, антител и других продуктов.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8).

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaerberlein M., Burtner C.R., Kennedy B.K. Recent developments in yeast aging // PLoS Genet. 2007. Vol. 3. N 5: e84.
2. Longo V.D., Shadel G.S., Kaerberlein M., Kennedy B. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae* // Cell Metab. 2012. Vol. 16. N 1. P. 18–31.
3. Aging research in yeast // Subcellular Biochemistry / Ed. M. Breitenbach, S.M. Jazwinski, and P. Laun. Dordrecht; Heidelberg; London; N.Y.: Springer, 2012. 368 pp.
4. MacLean M., Harris N., Piper P.W. Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms // Yeast. 2001. Vol. 18. N 6. P. 499–509.
5. Fabrizio P., Longo V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* // Aging Cell. 2003. Vol. 2. N 2. P. 73–81.
6. Barnes D.E., Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells // Annu. Rev. Genet. 2004. Vol. 38. P. 445–476.
7. Faucher F., Duclos S., Bandaru V., Wallace S.S., Doublié S. Crystal structures of two archaeal 8-oxoguanine DNA glycosylases provide structural insight into guanine/8-oxoguanine distinction // Structure. 2009. Vol. 17. N 5. P. 703–712.
8. Herrera-Cruz M.S., Simmen T. Of yeast, mice and men: MAMs come in two flavors // Biol. Direct. 2017. Vol. 12: 3.
9. Morgunova G.V., Klebanov A.A. Age-Related AMP-activated protein kinase alterations: From cellular energetics to longevity // Cell Biochem. Funct. 2019. Vol. 37. N 3. P. 169–176.
10. Zimmermann A., Hofer S., Pendl T., Kainz K., Madeo F., Carmona-Gutierrez D. Yeast as a tool to identify antiaging compounds // FEMS Yeast Res. 2018. Vol. 18. N 6: foy020.
11. Chartrain M., Chu L. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies // Curr. Pharm. Biotechnol. 2008. Vol. 9. N 6. P. 447–467.
12. Jeong D.W., Cho I.T., Kim T.S., Bae G.W., Kim I.H., Kim I.Y. Effects of lactate dehydrogenase suppression and
- glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism // Mol. Cell. Biochem. 2006. Vol. 284. N 1–2. P. 1–8.
13. Lai T., Yang Y., Ng S.K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production // Pharmaceuticals. 2013. Vol. 6. N 5. P. 579–603.
14. Lewis N.E., Liu X., Li Y., Nagarajan H., Yerganian G., O'Brien E., Bordbar A., Roth A.M., Rosenbloom J., Bian C., Xie M. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome // Nat. Biotechnol. 2013. Vol. 31. N 8. P. 759–765.
15. Fischer S., Handrick R., Otte K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives // Biotechnol. Adv. 2015. Vol. 33. N 8. P. 1878–1896.
16. Brown A.J., James D.C. Precision control of recombinant gene transcription for CHO cell synthetic biology // Biotechnol. Adv. 2016. Vol. 34. N 5. P. 492–503.
17. Golabgir A., Gutierrez J.M., Hefzi H., Li S., Pals-son B.O., Herwig C., Lewis N.E. Quantitative feature extraction from the Chinese hamster ovary bioprocess bibliome using a novel meta-analysis workflow // Biotechnol. Adv. 2016. Vol. 34. N 5. P. 21–633.
18. Hefzi H., Ang K.S., Hanscho M., Bordbar A., Ruckebauer D., Lakshmanan M., Orellana C.A., Baycin-Hizal D., Huang Y., Ley D., Martinez V.S. A consensus genome-scale reconstruction of Chinese hamster ovary cell metabolism // Cell Systems. 2016. Vol. 3. N 5. P. 434–443.
19. Kim J.Y., Kim Y.G., Lee G.M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 93. N 3. P. 917–930.
20. Altamirano C., Paredes C., Cairo J.J., Godia F. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine // Biotechnol. Progr. 2000. Vol. 16. N 1. P. 69–75.
21. Kim S.H., Lee G.M. Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44) // Appl. Microbiol. Biot. 2007. Vol. 76. N 3. P. 659–665.
22. Li J., Wong C.L., Vijayasankaran N., Hudson T., Amanullah A. Feeding lactate for CHO cell culture processes:

impact on culture metabolism and performance // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. Vol. 109. N 5. P. 1173–1186.

23. Toussaint C., Henry O., Durocher Y. Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures // *J. Biotechnol.* 2016. Vol. 217. P. 122–131.

24. Brunner M., Doppler P., Klein T., Herwig C., Fricke J. Elevated pCO₂ affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes // *Eng. Life Sci.* 2018. Vol. 18. N 3. P. 204–214.

25. Zhou M., Crawford Y., Ng D., Tung J., Pynn A.F., Meier A., Yuk I.H., Vijayasankaran N., Leach K., Joly J., Snedecor B. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases // *J. Biotechnol.* 2011. Vol. 153. N 1–2. P. 27–34.

26. Yip S.S., Zhou M., Joly J., Snedecor B., Shen A., Crawford Y. Complete knockout of the lactate dehydrogenase A gene is lethal in pyruvate dehydrogenase kinase 1, 2, 3 down-regulated CHO cells // *Mol. Biotechnol.* 2014. Vol. 56. N 9. P. 833–838.

27. Noh S.M., Park J.H., Lim M.S., Kim J.W., Lee G.M. Reduction of ammonia and lactate through the coupling of glutamine synthetase selection and downregulation of lactate dehydrogenase-A in CHO cells // *App. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 101. N 3. P. 1035–1045.

28. Oguchi S., Saito H., Tsukahara M., Tsumura H. pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture // *Cytotechnology.* 2006. Vol. 52. N 3. P. 199–207.

29. Kim Y.J., Baek E., Lee J.S., Lee G.M. Autophagy and its implication in Chinese hamster ovary cell culture // *Biotechnol. Lett.* 2013. Vol. 35. N 11. P. 1753–1763.

30. Fomina-Yadlin D., Gosink J.J., McCoy R., Follstad B., Morris A., Russell C.B., McGrew J.T. Cellular responses to individual amino-acid depletion in antibody-expressing and parental CHO cell lines // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. Vol. 111. N 5. P. 965–979.

31. Yoon S.K., Choi S.L., Song J.Y., Lee G.M. Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 °C // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. Vol. 89. N 3. P. 345–356.

32. Wilkens C.A., Altamirano C., Gerdtsen Z.P. Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2011. Vol. 16. N 4. P. 714–724.

33. Tsao Y.S., Cardoso A.G., Condon R.G., Voloch M., Lio P., Lagos J.C., Kearns B.G., Liu Z. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism // *J. Biotechnol.* 2005. Vol. 118. N 3. P. 316–327.

34. Lao M.S., Toth D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture // *Biotechnol. Prog.* 1997. Vol. 13. N 5. P. 688–691.

35. Kim T.K., Ryu J.S., Chung J.Y., Kim M.S., Lee G.M. Osmoprotective effect of glycine betaine on thrombopoietin production in hyperosmotic Chinese hamster ovary cell culture: clonal variations // *Biotechnol. Progr.* 2000. Vol. 16. N 5. P. 775–781.

36. Kim M.S., Kim N.S., Sung Y.H., Lee G.M. Biphasic culture strategy based on hyperosmotic pressure for improved humanized antibody production in Chinese hamster ovary cell culture // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal.* 2002. Vol. 38. N 6. P. 314–319.

37. Takagi M., Hayashi H., Yoshida T. The effect of osmolarity on metabolism and morphology in adhesion and suspension Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator // *Cytotechnology.* 2000. Vol. 32. N 3. P. 171–179.

38. Zhang X., Garcia I.F., Baldi L., Hacker D.L., Wurm F.M. Hyperosmolarity enhances transient recombinant protein yield in Chinese hamster ovary cells // *Biotechnol. Lett.* 2010. Vol. 32. N 11. P. 1587–1592.

39. Warburg O. On the origin of cancer cells // *Science.* 1956. Vol. 123. N 3191. P. 309–314.

40. Liberti M.V., Locasale J.W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? // *Trends Biochem. Sci.* 2016. Vol. 41. N 3. P. 211–218.

41. Shestov A.A., Liu X., Ser Z., Cluntun A.A., Hung Y.P., Huang L., Kim D., Le A., Yellen G., Albeck J.G., Locasale J.W. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step // *eLife.* 2014. Vol. 3: e03342.

42. DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation // *Cell Metab.* 2008. Vol. 7. N 1. P. 11–20.

43. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation // *Science.* 2009. Vol. 324. N 5930. P. 1029–1033.

44. Brand K. Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1997. Vol. 29. N 4. P. 355–364.

45. Zagari F., Jordan M., Stettler M., Broly H., Wurm F.M. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity // *N. Biotechnol.* 2013. Vol. 30. N 2. P. 238–245.

46. Hong J.K., Nargund S., Lakshmanan M., Kyriakopoulos S., Kim D.Y., Ang K.S., Leong D., Yang Y., Lee D.Y. Comparative phenotypic analysis of CHO clones and culture media for lactate shift // *J. Biotechnol.* 2018. Vol. 283. P. 97–104.

47. Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Singer R.A., Werner-Washburne M. “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. Vol. 68. N 2. P. 187–206.

48. Wierman M.B., Maqani N., Strickler E., Li M., Smith J.S. Caloric restriction extends yeast chronological lifespan by optimizing the Snf1 (AMPK) signaling pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2017. Vol. 37. N 13: e00562–16.

49. Buchsteiner M., Quek L.E., Gray P., Nielsen L.K. Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect // *Biotechnol. Bioeng.* 2018. Vol. 115. N 9. P. 2315–2327.

50. Wilkens C.A., Gerdtsen Z.P. Comparative metabolic analysis of CHO cell clones obtained through cell engineering, for IgG productivity, growth and cell longevity // *PLoS One.* 2015. Vol. 10. N 3: e0119053.

51. Altamirano C., Illanes A., Becerra S., Cairó J.J., Gòdia F. Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose // *J. Biotechnol.* 2006. Vol. 125. N 4. P. 547–556.

52. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium // *J. Physiol.* 2004. Vol. 558. N 1. P. 5–30.

53. Zilberter Y., Zilberter T., Bregestovski P. Neuronal activity in vitro and the in vivo reality: the role of energy homeostasis // *Trends Pharmacol. Sci.* 2010. Vol. 31. N 9. P. 394–401.

54. Wyss M.T., Jolivet R., Buck A., Magistretti P.J., Weber B. *In vivo* evidence for lactate as a neuronal energy source // J. Neurosci. Res. 2011. Vol. 31. N 20. P. 7477–7485.
55. Pellerin L., Bouzier-Sore A.K., Aubert A., Serres S., Merle M., Costalat R., Magistretti P.J. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update // Glia. 2007. Vol. 55. N 12. P. 1251–1262.
56. Orozco H., Matallana E., Aranda A. Two-carbon metabolites, polyphenols and vitamins influence yeast chronological life span in winemaking conditions // Microbial cell factories. 2012. Vol. 11: 104.
57. Aranda A., Orozco H., Picazo C., Matallana E. Yeast life span and its impact on food fermentations // Fermentation. 2019. Vol. 5. N 2: 37.
58. Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. N 4. P. 1616–1623.
59. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.
60. Morgunova G.V., Klebanov A.A. Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsub-cultured culture under the influence of exogenous oxidized guanoside is manifested only in the stationary phase of growth // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 3. P. 124–129.
61. Morgunova G.V., Karmushakov A.F., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Studies into the effect of “mild” uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2019. Vol. 74. N 3. P. 163–169.
62. Matés J.M., Di Paola F.J., Campos-Sandoval J.A., Mazurek S., Márquez J. Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer // Semin. Cell Dev. Biol. 2020. Vol. 98. P. 34–43.
63. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Klebanov A.A. Demographic approaches to the study of aging on cell cultures // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2019. Vol. 74. N 4. P. 262–267.
64. Yang Y., Santos A.L., Xu L., Lotton C., Taddei F., Lindner A.B. Temporal scaling of aging as an adaptive strategy of *Escherichia coli* // Sci. Adv. 2019. Vol. 5: eaaw2069.

Поступила в редакцию 08.06.2020 г.

После доработки 26.08.2020 г.

Принята в печать 15.09.2020 г.

REVIEW

Chinese hamster cells in biotechnological and gerontological research

G.V. Morgunova 

*Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

One of the most frequently used model objects in gerontology is yeast, primarily *Saccharomyces cerevisiae*. A significant amount of data has been accumulated, allowing to believe that in yeast undergoing chronological or “stationary phase” aging, damage is similar to age-related lesions in the cells of multicellular organism. However, studies on yeast, like on any objects, are not without drawbacks; in particular, although yeasts are eukaryotes, in terms of evolution they are far from mammals, which impose a limitation on the studies of non-conservative metabolic pathways in yeast. In some cases, mammalian cells are better for chronological model experiments, for example, Chinese hamster cells. They are actively used in industry for the manufacturing of monoclonal antibodies and recombinant proteins. A significant proportion of these products are produced after cessation of proliferation which initiates chronological aging of the culture. The accumulated data on the features of the function of cell metabolism, growth, culture and the duration of its functional activity are extremely valuable for gerontologists. The exchange of information between these two branches – biotechnological and gerontological – will be beneficial to both parties.

Keywords: cell aging, cell cultures, “stationary phase aging”, chronological aging, metabolism, lactate, Warburg effect

Сведения об авторах

Моргунова Галина Васильевна — канд. биол. наук, науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5259-0861>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.64

Новые штаммы бактерий *Pseudomonas laurentiana* — перспективные агенты для агробиотехнологии**Г.Ф. Рафикова* , Е.В. Кузина, Т.Ю. Коршунова, О.Н. Логинов***Уфимский Институт биологии, Уфимский федеральный исследовательский центр, РАН,
450054, г. Уфа, просп. Октября, д. 69, лит. Е***e-mail: rgf07@mail.ru*

Из активного ила биологических очистных сооружений были выделены штаммы бактерий АНТ 17 и АНТ 56, обладающие способностью к подавлению роста фитопатогенного гриба *Bipolaris sorokiniana*. Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств, а также нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и состава жирных кислот клеточных стенок показало принадлежность штаммов АНТ 17 и АНТ 56 к виду *Pseudomonas laurentiana*. Было установлено, что штаммы — *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 — обладают комплексом свойств, характерных для PGP-микроорганизмов (от англ. plant growth-promoting — способствующие росту растений): проявляют антигрибную активность в отношении фитопатогенных микромицетов, способны к разложению фосфатов и синтезу фитогормональных веществ. Инокуляция обоими штаммами семян растений огурца, томата и капусты оказывала благоприятное воздействие на их всхожесть. Предпосевная обработка семян пшеницы в условиях естественного инфекционного фона инокулятом выделенных штаммов бактерий способствовала снижению распространения грибов, вызывающих корневые гнили. Предполагается возможность применения штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 в биотехнологии с целью повышения продуктивности агроэкосистем. Способность к стимулированию роста и развития растений для штаммов вида *P. laurentiana* показана впервые.

Ключевые слова: *Pseudomonas laurentiana*, PGP-микроорганизмы, ген 16S рРНК, антигрибная активность, индолилуксусная кислота, цитокинины

Род *Pseudomonas* на сегодняшний день является наиболее многочисленной группой грамотрицательных бактерий и включает более 191 вида. Представители рода обладают широкими метаболическими возможностями и являются обитателями различных сред и источников, таких как вода, почва, растения, животные. Они выполняют функции, связанные с разложением органических веществ, стимулированием роста растений и др., а также могут оказывать патогенное воздействие [1].

Среди псевдомонад большое количество штаммов, относящихся к группе PGPR (от англ. plant growth-promoting rhizobacteria — ризобактерии, способствующие росту растений). PGPR могут усиливать рост растений с помощью самых разнообразных механизмов: биологической фиксации азота, солюбилизации фосфатов, синтеза фитогормонов, сидерофоров, антибиотических веществ, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-деаминазы, летучих органических соединений, индукции системной устойчивости и др. [2]. В почве PGPR могут эффективно конкурировать с аборигенной микробиотой, приживаться в ризосфере растений и затем функционировать в особых условиях данной экосистемы [3].

В настоящей работе представлено описание таксономического положения и комплекса полезных для растений свойств у двух новых PGP-штаммов рода *Pseudomonas*, которые в рамках данного исследования были идентифицированы как представители вида *P. laurentiana*. Этот вид был открыт относительно недавно [4], и его типовой штамм описан как микроорганизм, способный к окислению Mn(III). Способность к стимулированию роста и развития растений для штаммов вида *P. laurentiana* показана впервые.

Материалы и методы

Объектами исследования служили штаммы бактерий: АНТ 17 — выделенный из проб активного ила биологических очистных сооружений нефтеперерабатывающего предприятия, расположенного в г. Орск (Оренбургская область); АНТ 56 — выделенный из проб активного ила биологических очистных сооружений предприятия, являющегося крупным производителем кальцинированной, пищевой и каустической соды в России (г. Стерлитамак, Республика Башкортостан).

Бактерии рода *Pseudomonas* выделяли на жидкой среде Козера с 0,1% соли пировиноградной кислоты в качестве источника углерода [5].

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов определяли по общепринятым методикам [6] при выращивании на мясопептонном агаре (МПА) и селективных средах Кинг А и Кинг Б [5]. Первичную идентификацию бактерий проводили согласно определителю Берджи [7].

Аmplификацию гена 16S рРНК осуществляли с использованием универсальных праймеров [8]. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов проводили с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе «ABI PRISM 3730» (Applied Biosystems, США). Поиск нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, гомологичных соответствующим последовательностям исследуемого штамма, и расчет их попарного сходства проводили с помощью сервера EzBioCloud (<http://ezbiocloud.net>) [9]. Дендрограммы филогенетического сходства строили в программе MEGA X [10] методом neighbor-joining [11] с использованием двухпараметрической модели Кимура [12].

Состав жирных кислот клеточных стенок исследуемых штаммов определяли с помощью идентификационной системы Sherlock 6.1 (MIDI; Microbial ID) в соответствии с техническими инструкциями этой системы [13].

Наличие способности к синтезу индолилуксусной кислоты (ИУК) и цитокининоподобных веществ выявляли с помощью иммуноферментного анализа так, как описано ранее [14].

Антагонистические свойства выделенных штаммов бактерий в отношении фитопатогенных микромицетов оценивали в условиях *in vitro* методом совместного культивирования в чашках Петри [15]. Засеянные чашки инкубировали в течение 72 ч при 28°C. В качестве тест-организмов, обладающих фитопатогенной активностью, использовали *Fusarium avenaceum* ВКМ 132, *F. culmorum* ВКМ 844, *F. gibbosum* ВКМ 848, *F. nivale* ВКМ 3106, *F. oxysporum* ВКМ 137, *F. semitectum* ВКМ 1938, *F. solani* ВКМ 142, *Bipolaris sorokiniana* ИБ Г-12. Последняя культура является местным изолятом и хранится в Коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии Уфимского федерального исследовательского центра (УФИЦ) РАН.

Для изучения влияния железа на антигрибные свойства бактериальных штаммов проводили сравнение антагонистической активности бактерий на среде Кинг Б в отсутствие FeCl_3 и при добавлении 100 мкг/мл FeCl_3 .

Способность к гидролизу фосфатов изучали на средах Пиковской (состав (г/л): $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ — 5,0; глюкоза — 20,0; NaCl — 0,2; MgSO_4 — 0,1; MnSO_4 — следы; FeSO_4 — следы, агар-агар — 20,0) и Муромцева (состав (г/л): глюкоза — 10; аспара-

гин — 1; K_2SO_4 — 0,2; кукурузный экстракт — 0,02; агар-агар — 20; свежесажженный $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ — 1,5).

Для определения влияния бактериализации штаммами на всхожесть семян сельскохозяйственных культур использовали семена растений томата, огурца и капусты. Для обработки использовали разбавленную культуру бактерий (титр $\sim 10^5$ КОЕ/мл), выращенных на питательной среде Кинг Б. Контролем служили семена, замоченные в дистиллированной воде. Всхожесть семян определяли на вторые и четвертые сутки.

Изучение эффективности штаммов-антагонистов против комплекса возбудителей корневых гнилей проводили в лабораторных условиях на семенах мягкой яровой пшеницы (всхожесть 90,7%) с естественным уровнем заражения посевного материала спорами фитопатогенных грибов *F. oxysporum* и *B. sorokiniana*. В качестве эталонов использовали биопрепарат «Ризоплан» (0,5 л/т), основу которого составляет штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Через 7 сут учитывали распространение и развитие корневых гнилей проростков, а также распространение на семенах альтернариоза. Статистическую обработку данных проводили с использованием MS Excel. В таблицах данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Скрининг. В результате скрининга были выделены штаммы, обладающие способностью к росту на селективной среде для псевдомонад и образованию флуоресцирующих пигментов. Основным критерием для дальнейшего отбора бактерий являлась способность штаммов к подавлению роста фитопатогенного гриба *B. sorokiniana*, вызывающего гельминтоспориозные корневые гнили, темно-бурую пятнистость листьев, симптом «черного зародыша», сажистый налет на колосьях злаковых культур. В результате было отобрано два штамма — АНТ 17 и АНТ 56 — с наиболее высокой степенью антагонистической активности.

Идентификация новых PGP-штаммов. Клетки изучаемых штаммов АНТ 17 и АНТ 56 — грам-отрицательные подвижные палочки, не образующие споры. На плотной питательной среде МПА колонии округлые с ровными краями, гладкие, слабовыпуклые, непрозрачные, серовато-белые, диаметром 5–7 мм. На МПА и среде Кинг Б образуют желто-зеленый флуоресцирующий пигмент. На диагностической среде Кинг А образование синего пигмента не отмечено. На скошенном мясопептонном агаре штрих сплошной, с ровными краями. На жидкой среде (мясопептонный бульон) штамм АНТ 17 образует обильный, плотный, дискообразный осадок; штамм АНТ 56 — обильный, хлопьевидный осадок и тонкую, сплошную, рых-

лую пленку. Каталазо- и оксидазоположительные, метаболизм — дыхательный. Оптимальная температура роста — 28°C, растут при 4°C и в присутствии 3% NaCl. Не нуждаются в дополнительных органических факторах роста. Не восстанавливают нитрат до нитритов, синтезируют аргининдегидролазу. Не гидролизуют желатин, крахмал и лецитин. Не способны к образованию левана из сахарозы и липолизу Твин-80. Оба штамма утилизируют с образованием кислоты следующие углеводы: глюкозу, ксилозу, арабинозу, галактозу. Используют широкий диапазон субстратов: сахарозу, мальтозу, фруктозу, глицерин, этанол, пропанол, бутанол, гексанол, пропионовую, янтарную, α-кетоглутаровую кислоты, ацетат, пируват, лактат, цитрат, DL-лейцин, L-аргинин, DL-α-аланин, DL-валин, L-пролин, DL-лизин, L-тирозин, L-аспарагин, фенилаланин. Способны к росту на безазотистой среде Эшби.

Кроме того, штамм АНТ 56 образует кислоты из раффинозы, лактозы, рамнозы. Использует изомасляную кислоту, не использует маннит, сорбит, L-инозит, малеиновую, адипиновую и антраниловую кислоты, оксалат, DL-треонин, DL-серин, DL-метионин, DL-цистеин, DL-триптофан, D-аспарагин, тетрадекан, октадекан, ацетамид, формальдегид, фенол. Продуцирует экзополисахарид при росте в жидкой культуре на картофельно-глюкозной среде и среде Федорова с мелассой в качестве источника углерода.

При нанесении живых клеток исследуемых штаммов бактерий на срезы картофеля не наблю-

далось разрушения растительных клеток, что свидетельствует об отсутствии фитопатогенной активности у данных штаммов.

По совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штаммы АНТ 17 и АНТ 56 были предварительно идентифицированы как принадлежащие к роду *Pseudomonas* и депонированы в Коллекцию микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН под номерами IB-B 5-17 и IB-B 5-56 соответственно.

Для изучаемых микроорганизмов было проведено секвенирование гена, кодирующего 16S рРНК. Нуклеотидные последовательности штаммов АНТ 17 (1402 п.н.) и АНТ 56 (1344 п.н.) депонированы в GenBank (MN541118 и MN541119 соответственно).

В результате их сравнительного анализа установлено, что максимальное сходство штамма АНТ 17 наблюдалось с типовыми штаммами *P. laurentiana* GSL-010^T (99,29%), *P. japonica* NBRC 103040^T (98,79%) и *P. huaxiensis* WCHPs060044^T (98,79%).

Степень гомологии между нуклеотидными последовательностями гена 16S рРНК штамма АНТ 56 и штаммов *P. laurentiana* GSL-010^T, *P. rhizosphaerae* DSM16299^T, *P. japonica* NBRC 103040^T была равна 99,63, 99,18 и 99,11% соответственно.

С целью уточнения филогенетического положения было построено древо на основе сравнительных данных о последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК видов, относящихся к роду *Pseudomonas* (рисунок). На дендрограмме видно,

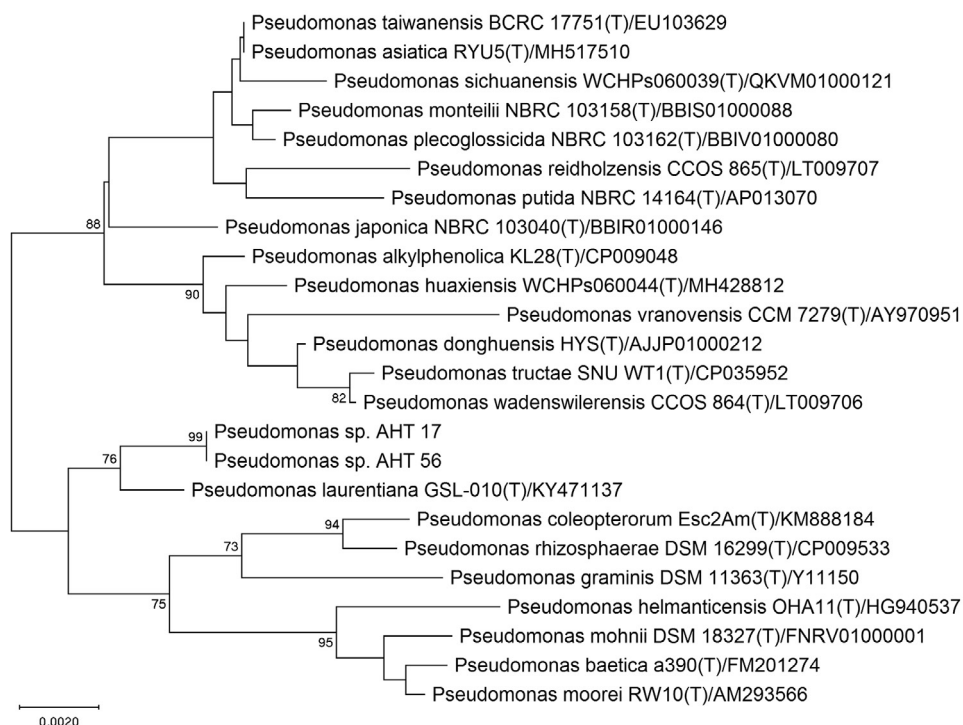


Рисунок. Филогенетическое положение штаммов *Pseudomonas* sp. АНТ 17 и *Pseudomonas* sp. АНТ 56, основанное на анализе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее двум нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа (приведены значения «bootstrap»-анализа выше 70%).

что изучаемые микроорганизмы образуют общий кластер, при этом филогенетически наиболее близким к ним штаммом является типовой представитель вида *P. laurentiana* (*P. laurentiana* GSL-010^T).

В качестве еще одного таксономического признака был изучен жирнокислотный состав клеточной стенки штаммов АНТ 17 и АНТ 56 (табл. 1). В ходе исследований было показано, что в профилях обоих штаммов доминирующими являлись гексадекановая (C16:0), комбинация гексадеценовой и пентадеценовой (C16:1 ω7c + C15:1 iso 2-OH), цис-11-октадеценовая (C18:1 ω7c) и гексадеценовая (C16:1) жирные кислоты. В целом жирнокислотный профиль штаммов соответствует таковому у типового штамма вида *P. laurentiana* GSL-010.

Таблица 1

Содержание жирных кислот в клетках штаммов *Pseudomonas* sp. АНТ 17, *Pseudomonas* sp. АНТ 56 и *P. laurentiana* GSL-010^T [4] (% от суммарного)

Жирные кислоты	<i>Pseudomonas</i> sp. АНТ 17	<i>Pseudomonas</i> sp. АНТ 56	<i>P. laurentiana</i> GSL-010 ^T
C10:0	0,2	—	0,1
C12:0	2,5	2,3	2,7
C14:0	1,4	1,9	1,8
C15:0	—	0,3	0,4
C16:0	37,1	33,6	32,3
C17:0	0,2	—	0,1
C18:0	0,2	0,5	0,2
C16:1	8,3	15,0	—
C18:1	1,9	0,7	—
C16:1 ω5c	—	—	0,1
C17:1 ω8c	—	—	0,1
C18:1 ω7c	11,2	10,0	8,3
C17:0 cyclo	1,0	2,8	1,1
C18:1 methyl ω7c	—	—	0,4
C10:0 3-OH	—	—	3,8
C12:0 2-OH	3,4	4,3	4,2
C12:0 3-OH	2,3	4,0	3,7
C12:1 3-OH	—	—	0,1
C16:1 ω7c + C15:1 iso 2-OH	29,2	24,6	40,4
C19:1 ω6c + C19:1 cyclo ω10c	1,1	—	0,2

Примечание: «—» — не обнаружено.

Таким образом, на основании сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и состава жирных кислот клеточной стенки, а также культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков штаммы АНТ 17 и АНТ 56 были идентифицированы как представители вида *Pseudomonas laurentiana*.

Характеристика новых PGP-штаммов

Антагонистическая активность. При изучении спектра антагонистической активности штаммов бактерий *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 было показано, что микроорганизмы подавляют развитие фитопатогенных грибов родов *Bipolaris* и *Fusarium* (табл. 2). Изучаемые

штаммы бактерий проявляли избирательность в отношении данных микромицетов, диаметры зон ингибирования роста фитопатогенов значительно варьировали. При этом штаммы наиболее активно подавляли рост *B. sorokiniana* ИБ Г-12 и *F. semitectum* ВКМ 1938. Показатели антагонистической активности исследуемых штаммов сопоставимы с таковыми известных штаммов-антагонистов рода *Pseudomonas* [16, 17].

Таблица 2

Спектр антагонистической активности штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56

Виды фитопатогенных грибов	Диаметр зоны ингибирования роста гриба, мм	
	<i>P. laurentiana</i> АНТ 17	<i>P. laurentiana</i> АНТ 56
<i>Fusarium avenaceum</i> ВКМ 132	7,0±1,1	7,0±0,9
<i>F. culmorum</i> ВКМ 844	12,0±1,6	17,0±1,9
<i>F. gibbosum</i> ВКМ 848	11,0±1,5	10,0±1,3
<i>F. nivale</i> ВКМ 3106	10,0±1,0	8,0±1,2
<i>F. oxysporum</i> ВКМ 137	10,0±1,4	6,0±0,8
<i>F. semitectum</i> ВКМ 1938	26,0±3,0	21,0±2,5
<i>F. solani</i> ВКМ 142	10,0±1,2	10,0±1,0
<i>Bipolaris sorokiniana</i> ИБ Г-12	26,0±2,8	30,0±3,3

Природа антигрибных метаболитов. Известно, что антагонизм микроорганизмов может быть связан с синтезом железотранспортирующих агентов-сидерофоров, конкурирующих с сидерофорами фитопатогенных микроорганизмов за необходимое для последних железо.

Было показано, что внесение железа в питательную среду не приводит к изменению антигрибной активности штаммов бактерий. Так, на среде Кинг Б с внесением FeCl₃ диаметр зоны подавления роста фитопатогена *B. sorokiniana* для штамма *P. laurentiana* АНТ 17 составил 26 мм, для штамма *P. laurentiana* АНТ 56 — 32 мм.

Таким образом, было установлено, что антагонистическая активность штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 не лимитируется присутствием железа в среде, т.е. и антигрибные свойства культур определяются синтезом не сидерофоров, а, вероятно, веществ антибиотической природы.

Синтез фитогормонов — одно из важнейших свойств бактерий, отнесенных к группе PGPR. У штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 была изучена способность к продуцированию фитогормонов — индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и цитокининоподобных веществ. Известно, что ИУК участвует в регуляции деления и роста клеток растяжением, дифференцировке корней и других процессах роста и развития растения [18, 19], в то время как цитокинины и цитокининоподобные вещества индуцируют деление клеток и участвуют в поддержании апикальной меристемы побега [20].

Значимое количество иммунореактивных веществ было обнаружено в культуральной жидко-

сти штамма *P. laurentiana* АНТ 17. Данный микроорганизм обладал способностью к синтезу ИУК в количестве 804 нг/мл культуральной жидкости и не продуцировал цитокинины. Штамм бактерий *P. laurentiana* АНТ 56 синтезировал ИУК и цитокинины в количестве 166 и 68 нг/мл культуральной жидкости соответственно. Количество ИУК, накапливаемое в культуральной жидкости исследуемыми штаммами, превышало значения данного показателя для продуцента фитогормонов *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 (ВКМ В-2830D), описанного нами ранее [21], для которого оно составляло 40 нг/мл культуральной жидкости. Однако штамм *P. laurentiana* АНТ 56 уступал ему в продукции цитокининов.

Фосфатмобилизирующая активность. Способность микроорганизмов к растворению органических и неорганических соединений фосфора в почве играет важную роль в питании растений. Синтез бактериями метаболитов в виде кислот и ферментов (фосфатаз) влияет на подвижность данного органогенного элемента и последующую его доступность для растений. При изучении способности к превращению соединений фосфора у штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 на питательных средах Пиковской и Муромцева было отмечено образование четких зон просветления, что свидетельствует о наличии мобилизирующей активности данных бактерий в отношении неорганических фосфатов. Способности к расщеплению органических соединений фосфора при выращивании бактерий на среде, содержащей органический фосфор в виде аденозинтрифосфата натрия, установлено не было.

Влияние на всхожесть растений. Во всех вариантах опыта было отмечено положительное влияние инокуляции бактериями семян сельскохозяйственных культур на их всхожесть по сравнению с контролем, что подтверждает наличие у изучаемых штаммов PGP-свойств. При этом наиболее «отзывчивыми» на предпосевную обработку оказались семена капусты и огурца — их всхожесть на четвертые сутки увеличилась в среднем на 7% и 9% соответственно по сравнению с контролем. Бактеризация штаммами микроорганизмов ускоряла процесс прорастания семян томатов: на вторые сутки их всхожесть превышала значения контроля на 7–9%, однако к четвертым суткам различия между контроль-

ным и опытными вариантами были статистически не значимы (при $p \leq 0,05$).

Эффективность против комплекса возбудителей корневых гнилей. Было показано, что в условиях естественной зараженности семян обработка штаммами бактерий *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 способствует снижению распространения грибов рода *Alternaria* на 38,3% и 50,6% соответственно и гельминтоспориозной корневой гнили, вызываемой *B. sorokiniana*, на 71,4% и 87,3% (табл. 3).

Используемый в качестве эталона биопрепарат «Ризоплан» демонстрировал высокую степень биологической эффективности по отношению к вызывающему корневые гнили пшеницы микромицету *B. sorokiniana* (71,4%), но оказался малоэффективным против альтернариоза проростков. Это свидетельствует о том, что в случае естественного инфекционного фона показатели эффективности воздействия на фитопатогены у исследуемых штаммов были не ниже, чем у известных биологических препаратов.

При обработке биопрепаратом «Ризоплан» и жидкой культурой штамма *P. laurentiana* АНТ 17 количество непроросших семян было меньше, чем в контроле (табл. 3). При этом в варианте со штаммом *P. laurentiana* АНТ 56 достоверных различий с контролем по данному параметру не было выявлено.

Показатель, характеризующий долю ненормально развивающихся проростков при обработке бактериями, в том числе биопрепаратом «Ризоплан», был в 2–3 раза меньше, чем в контроле. Это свидетельствует о снижении поражения тканей растений пшеницы фитопатогенными микромицетами вследствие воздействия антигрибных метаболитов PGP-бактерий.

Таким образом, на основании анализа физиолого-биохимических свойств, нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и состава жирных кислот клеточной стенки была установлена принадлежность штаммов бактерий АНТ 17 и АНТ 56 к виду *Pseudomonas laurentiana*.

Было показано, что штаммы *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 обладают целым рядом полезных для роста и развития растений свойств, характерных для PGP-микроорганизмов. В частности, они проявляют антигрибную активность в отношении большого количества фитопатогенов.

Таблица 3

Эффективность применения штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 против семенной инфекции пшеницы

Вариант	Непроросшие семена, %	Ненормально развившиеся проростки, %	Количество проростков пшеницы, пораженных болезнями, %	
			<i>B. sorokiniana</i>	<i>Alternaria</i> sp.
Контроль	11,0±0,7*	18,0±0,9*	48,6±1,2*	12,6±0,8*
Биопрепарат «Ризоплан»	8,0±0,6*	8,6±1,2*	44,6±1,6*	3,6±0,2*
<i>P. laurentiana</i> АНТ 17	10,0±0,2*	6,6±0,5*	30,0±1,5*	2,0±0,1*
<i>P. laurentiana</i> АНТ 56	10,6±0,3	8,0±0,7*	24,0±1,1*	1,6±0,07*

Примечание: * — различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

тогенных микромицетов, способны к разложению неорганических фосфатов и синтезу фитогормональных веществ. Протравливание семян огурца, томата и капусты жидкой культурой с титром $\sim 10^5$ КОЕ/мл оказывало благоприятное воздействие на всхожесть растений. Предпосевная обработка семян пшеницы в условиях естественного инфекционного фона инокулятом выделенных штаммов бактерий способствовала снижению распространения грибов, вызывающих корневые гнили. По совокупности полезных свойств штаммы *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 можно признать перспективными для дальнейше-

го изучения с точки зрения применения в биотехнологии с целью повышения продуктивности агроэкосистем.

Исследование выполнено с использованием оборудования Регионального центра коллективного пользования «Агидель» в рамках госзадания УФИЦ РАН (№ 075-00326-19-00) по теме № АААА-А18-118022190100-9 на базе Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Работа осуществлена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dignam B.E., O'Callaghan M., Condon L.M., Raaijmakers J.M., Kowalchuk G.A., Wakelin S.A. Impacts of long-term plant residue management on soil organic matter quality, *Pseudomonas* community structure and disease suppressiveness // Soil Biol. Biochem. 2019. Vol. 135. P. 396–406.
2. Singh D., Ghosh P., Kumar J., Kumar A. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs): functions and benefits // Microbial interventions in agriculture and environment / Eds. D. Singh, G. Gupta, and R. Prabha. Singapore: Springer Nature, 2019. P. 205–227.
3. Fischer S., Principe A., Alvarez F. Fighting plant diseases through the application of *Bacillus* and *Pseudomonas* strains // Symbiotic endophytes: soil biology, vol. 37 / Ed. R. Aroca. Berlin: Springer Verlag, 2013. P. 165–193.
4. Wright M.H., Hanna J.G., Pica D.A., Tebo B.M. *Pseudomonas laurentiana* sp. nov., an Mn(III)-oxidizing bacterium isolated from the St. Lawrence Estuary // Phycologia. 2018. Vol. 8. N 4. P. 153–157.
5. Deshmukh A.M. Handbook of media, stains and reagents in microbiology. New Delhi: PAMA Publication, 1997. 240 pp.
6. Gerhardt P. Manual of methods for general bacteriology. Washington: American Society of Microbiology, 1981. 524 pp.
7. Bergey's Manual of systematic bacteriology. The Proteobacteria, part B, the Gammaproteobacteria / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, and J.T. Staley. N.Y.: Springer, 2004. P. 323–379.
8. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematics / Eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., 1991. P. 115–177.
9. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chan J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. Vol. 67. N 5. P. 1613–1617.
10. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. Vol. 35. N 6. P. 1547–1549.
11. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4. N 4. P. 406–425.
12. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. Vol. 16. N 2. P. 111–120.
13. Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note #101 // MIDI. Newark: MIDI Inc., 1990.
14. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L.Yu., Galimsyanova N.F., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Veselov S.Yu. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants // Acta Physiol. Plant. 2017. Vol. 39. N 11: 253.
15. Chetverikov S.P., Loginov O.N. New metabolites of *Azotobacter vinelandii* exhibiting antifungal activity // Microbiol. 2009. Vol. 78. N 4. P. 428–432.
16. Yang M., Mavrodi D.V., Mavrodi O.V., Bonsall R.F., Parejko J.A., Paulitz T.C., Thomashow L.S., Yang H.-T., Weller D.W., Guo J.-H. Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields // Phytopathology. 2011. Vol. 101. N 12. P. 1481–1491.
17. Zakharchenko N.S., Kochetkov V.V., Buryanov Y.I., Boronin A.M. Effect of rhizosphere bacteria *Pseudomonas aureofaciens* on the resistance of micropropagated plants to phytopathogens // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. Vol. 47. N 7: 661.
18. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // FEMS Microbiol. Rev. 2007. Vol. 31. N 4. P. 425–448.
19. Francis I., Holsters M., Vereecke D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions // Environ. Microbiol. 2010. Vol. 12. N 1. P. 1–12.
20. Zhao Z., Andersen S.U., Ljung K., Dolezal K., Miotk A., Schultheiss S.J., Lohmann J.U. Hormonal control of the shoot stem-cell niche // Nature. 2010. Vol. 465. N 7301. P. 1089–1092.
21. Rafikova G.F., Korshunova T.Yu., Minnebaev, L.F., Chetverikov, S.P., Loginov O.N. A new bacterial strain *Pseudomonas koreensis* IB-4, as a promising agent for plant pathogen biological control // Microbiology. 2016. Vol. 85. N 3. P. 333–341.

Поступила в редакцию 27.02.2020 г.

После доработки 17.08.2020 г.

Принята в печать 15.09.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

New bacterial strains *Pseudomonas laurentiana* as promising agents for agrobiotechnology

G.F. Rafikova* , E.V. Kuzina, T.Yu. Korshunova, O.N. Loginov

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
st. Prospect Oktyabrya 69, lit. E, Ufa, 450054, Russia

*e-mail: rgf07@mail.ru

Bacterial strains ANT 17 and ANT 56 were isolated from activated sludge, antagonistic to plant pathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana*. Physiological, biochemical, and culture morphological properties, analysis of the 16S rRNA gene sequence and composition of fatty acids of cell walls of strains AHT 17 and AHT 56 supported its classification within the species *Pseudomonas laurentiana*. It was shown that strains *P. laurentiana* AHT 17 and *P. laurentiana* AHT 56 possess a set of properties characteristic of PGP microorganisms: they exhibit antifungal activity against phytopathogenic micromycetes, are capable of decomposing phosphates and synthesizing phytohormonal substances. Inoculation of cucumber, tomato and cabbage seeds had a beneficial effect on their germination. Pre-sowing treatment of wheat seeds under the conditions of a natural infectious background with an inoculum of isolated bacterial strains contributed to a decrease in the spread of fungi that cause root rot. The possibility of using strains *P. laurentiana* and *P. laurentiana* AHT 56 in biotechnology in order to increase the productivity of agroecosystems. The ability to stimulate the growth and development of plants for strains of the *P. laurentiana* species was shown for the first time.

Keywords: *Pseudomonas laurentiana*, PGP-microorganisms, 16S rRNA gene, antifungal activity, indolylacetic acid, cytokinins

Сведения об авторах

Рафикова Гульназ Фаилевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел: 8-347-235-57-04; e-mail: rgf07@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7655-5588>

Кузина Елена Витальевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел: 8-347-235-57-04; e-mail: misshalen@mail.ru

Коршунова Татьяна Юрьевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел: 8-347-235-57-04; e-mail: korshunovaty@mail.ru

Логинов Олег Николаевич — докт. биол. наук, глав. науч. сотр. лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел: 8-347-235-57-04; e-mail: biolab316@yandex.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 581.52+581.8

Ксероморфные признаки листьев *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae) в засушливом климате Центральной Азии**Н.Г. Акиншина^{1,*} , Г.М. Дусчанова², А.А. Азизов¹, А.И. Халмурзаева², К.Н. Тодерич³**¹Национальный университет Узбекистана имени М. Улугбека, Узбекистан, 100174, Ташкент, ул. Университетская, д. 4;²Ташкентский ботанический сад имени академика Н.Ф. Русанова АН РУз, Узбекистан, 100140, Ташкент, ул. Богишамол, д. 232;³International Platform for Dryland Research and Education, Tottori University, 1390 Hamasaka, Tottori-city, 680-0001, Japan

*e-mail: n.akinshina@yahoo.com

В аридных зонах высокая освещенность местообитания в период вегетации сопряжена с высокой температурой и сухостью воздуха, что может стать причиной водного дефицита растений. Тюльпанное дерево (*Liriodendron tulipifera*) считается светолюбивым мезофитным видом. Проведенные исследования показывают, что в зависимости от световых условий *L. tulipifera* формирует теневые или световые листья, причем у листьев деревьев с хорошо освещенных местообитаний обнаружены ксероморфные особенности. Световые листья меньшего размера, более плотные и толстые, с более мелкими эпидермальными клетками и толстой кутикулой, губчатая паренхима состоит из большего числа рядов мелких клеток, клетки столбчатой паренхимы более крупные. В световом листе содержится на 20–30% больше хлорофилла, и замыкающие клетки устьиц содержат хлоропласты. Возможно, повышенная концентрация хлорофилла поддерживает уровень энергетического баланса при ингибировании фотосинтеза под действием высокой инсоляции и температуры. Уменьшение размеров светового листа и клеток эпидермы, утолщение кутикулы и клеточной стенки эпидермальных клеток, погруженность устьиц, компактный мезофилл с небольшими межклетниками, многорядная губчатая паренхима защищают от перегрева и пассивной потери влаги и могут рассматриваться как ксероморфные признаки. Крупные многочисленные устьица и проводящие пучки способствуют эффективному охлаждению поверхности путем транспирации при высоких температурах и достаточной водообеспеченности. Таким образом, лист *L. tulipifera* обладает экологической пластичностью по отношению к свету и температуре, что способствует акклимации вида в засушливом климате.

Ключевые слова: *Liriodendron tulipifera*, высокая освещенность, затенение, аридность, акклимация, ксероморфизм

Одна из задач экологии состоит в изучении формообразовательной роли внешней среды. Приспособление растений к условиям местообитания происходит в течение достаточно длительного времени, в результате появляются новые признаки, формируются новые формы и виды. Эволюция растений в естественных ареалах имеет мало общего с развитием флоры городов, и растительные сообщества города нельзя отождествлять с естественной флорой. Однако в результате акклимации интродуцированных видов могут наблюдаться процессы формообразования, аналогичные тем, которые протекают в природе, но с разной скоростью и степенью проявления.

Естественный ареал тюльпанного дерева (*Liriodendron tulipifera* L.) — горные леса Северной Америки, вместе с тем вид успешно культивируется в ботанических садах и городских парках мира,

отличающихся от естественных условий агроклиматическими характеристиками. В Узбекистане *L. tulipifera* интродуцировано в конце XIX в. и в настоящее время широко применяется в озеленении городов. Оно хорошо адаптировалось к местным условиям, обильно и долго цветет, дает самосевы. Вероятно, высокий уровень генетической изменчивости, подтвержденный современными исследованиями [1, 2], объясняет адаптивные способности и широкое географическое распространение *L. tulipifera*.

В ходе эволюции у многих растений сформировались адаптационные механизмы, позволяющие справляться с колебаниями условий среды. Адаптивные реакции проявляются на всех уровнях организации: меняются биохимические процессы в клетке, происходят структурные изменения в тканях, физиологические и морфологиче-

ские метаморфозы в целом организме. Солнечный свет, температура и водообеспеченность, как важнейшие абиотические факторы, определяют развитие и распространение растений и могут служить триггерами формообразования [3–6]. Примером акклимации растений к световым условиям местообитания является формирование теневых и световых листьев с характерными анатомическими и биохимическими различиями [5–7]. Следует отметить, что результаты изучения светозависимых реакций листа весьма противоречивы. Так, выявлено снижение фотосинтеза при низкой освещенности местообитания у *Populus tremula*, *Juglans nigra* x *Juglans regia*, *Prunus persica*, *Acer mono*, *A. palmatum*, *Citrus limon*, но противоположные данные описаны для *Acer rufinerve*, *Fagus sylvatica* и *Quercus ilex* [8].

Специфические морфологические и физиологические изменения, называемые ксероморфными, помогают растениям переносить водный дефицит и выживать в засушливых условиях [5–7]. Известно, что у мезофитных растений, населяющих более засушливые районы, появляются ксероморфные свойства. Например, листья мезофитов *Quercus rubra* L. и *Fraxinus pennsylvanica* Marsh, распространенных в Северной Америке, в аридных условиях становились меньше, толще, увеличивался их удельный вес, возрастали устьичная проводимость и скорость фотосинтеза [9, 10]. Ксероморфогенез признается важной общеботанической проблемой, поскольку является одним из основных путей эволюции растительного мира.

Тюльпанное дерево считается светолюбивым мезофитным видом [11–14], проявляющим высокую чувствительность к дефициту воды, хотя имеются данные о его теневыносливости в естественных условиях [15]. Ранее нами были обнаружены отличия в размере и толщине листьев *L. tulipifera* с местообитаний с разной освещенностью и температурой, при этом показатели скорости видимого фотосинтеза у них достоверно не отличались [16]. Напротив, в одной из работ [17] отмечено, что повышение температуры увеличивало содержание пигментов, скорость фотосинтеза, темнового дыхания и транспирации в листьях проростков лириодендрона. Выявлено, что озон активирует перекисное окисление липидов и уменьшает фотосинтетическую активность тюльпанного дерева, повреждая первый функциональный комплекс электрон-транспортной цепи хлоропластов (фотосистему II) [15, 18], уменьшение содержания хлорофилла и активация ксантофиллового цикла снижают улавливаемую световую энергию, ограничивая окислительные повреждения [19]. Подробно описана изменчивость листа *L. tulipifera* в субтропической климатической зоне в зависимости от возраста дерева и расположения на побеге; методами факторного и корреляционного анализа определены взаимо-

связи между морфологическими и анатомическими признаками [20]. Таким образом, имеется информация о реакциях *L. tulipifera* на воздействие условий среды обитания, но сведения об экологической пластичности листьев отсутствуют, что послужило основанием для выполнения данного исследования.

Целью работы было изучение морфологических и анатомических особенностей ассимиляционных органов *L. tulipifera* в разных условиях освещенности и температуры для оценки приспособленности данного вида к условиям засушливого климата.

Материалы и методы

Исследования проводились на экспозиции Северной Америки Ташкентского ботанического сада имени академика Н.Ф. Русанова. Ташкент расположен в семиаридной зоне на предгорной равнине Западного Тянь-Шаня, на высоте 440–480 м над уровнем моря. Климат переходный от умеренного континентального к субтропическому со значительными сезонными и суточными колебаниями температур, сухим жарким летом, влажной весной и неустойчивой зимой. Среднесуточная температура января +1,9°C, в апреле +15°C, в июле +27,7°C. Многолетняя средняя годовая сумма осадков составляет 440 мм. В летний период осадки практически отсутствуют.

Объектом изучения являлись достигнувшие конечных размеров листья *L. tulipifera* L. (род *Liriodendron* L., семейство Magnoliaceae Juss.). Это листопадное дерево более 50 м высоты с прямым стволом и конусовидной или шаровидной кроной. В естественных условиях произрастает в лесах на востоке Северной Америки и Канады на высоте 300–1500 м над уровнем моря при среднемесячных температурах от –7,2°C (январь) до +27,2°C (июль) и годовых осадках от 760 до 2030 мм [11]. Растение долговечное (300 лет), быстрорастущее, предпочитает среднеувлажненные, богатые органикой, кислые, хорошо дренированные почвы. В настоящее время тюльпанное дерево встречается в культуре в разных почвенно-климатических условиях, выращивается в субтропическом, умеренном и континентальном климате [13]. Листья крупные (10–15 см), лировидные, четырехлопастные, глянцевые, сверху светло-зеленые, снизу бледнее и более матовые, на тонких черешках 10–12 см длины. Прилистники широкие обратнойцевидные с выемкой на вершине, рано опадающие.

В работе изучались вторые-третьи листья с однолетних побегов 6–7 деревьев, условно названные световыми и теневыми; первые произрастали при высокой освещенности и температуре, вторые — в затенении под пологом других более крупных деревьев. Характеристики условий произрастания деревьев определялись регистрато-

ром ультрафиолетового света, освещенности, температуры и влажности TR-73Ui (T&D Corporation, Япония). В табл. 1 представлены результаты измерений некоторых показателей в жаркий период вегетации.

Таблица 1

Физические характеристики мест произрастания тюльпанного дерева, Ташкентский ботанический сад имени академика Н.Ф. Русанова

	Температура, °C	Влажность воздуха, %	Освещенность, лк	Интенсивность УФ-излучения, мВт/см ² ·ч
Свет	37,7±1,0	29,9±2,9	108533,3±994,3	1,62±0,14
Тень	32,3±0,9	39,8±0,5	5022,8±263,8	0,13±0,04

Примечание: измерения проводились в 10–11 часов утра в период с 20 июля по 20 августа 2019 г.

Удельная плотность листовой пластинки определялась гравиметрическим методом: из 20–30 листьев вырезались высечки диаметром 1 см (группами по 10 штук в 5–7 повторностях) и высушивались при 105°C до абсолютно сухого веса. Удельная плотность листовой пластинки рассчитывалась как масса сухого вещества (мг), приходящаяся на единицу поверхности (см²).

Концентрация хлорофиллов и каротиноидов определялась спектрофотометрически на двулучевом спектрофотометре UV/VIS-450 (Jasco Corporation, Япония) после быстрой гомогенизации высушенной при комнатной температуре высечки листа диаметром 1 см и экстракции охлажденным 80%-ным водным раствором ацетона (10 мл) при длинах волн 662, 644 и 440 нм (5–7 повторов). Работы проводились при охлаждении льдом. Содержание пигментов рассчитывалось по уравнениям Веттштейна [21].

Общее содержание пигментов измерялось на SPAD-502Plus (Konica Minolta, Япония). Проводилось по 40–50 измерений с каждого местообитания. Прибор измеряет спектральное поглощение в двух диапазонах спектра, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов, и на основании этих данных рассчитывает численное значение в единицах, пропорциональных содержанию хлорофилла.

Для анатомических исследований лист фиксировали в 70%-ном этаноле. Эпидерму изучали на парадермальных и поперечных срезах. Поперечные срезы листа сделаны через середину. Описания основных тканей и клеток приведены в соответствии с классическими методами [7, 22]. Измерение проводили в 30-кратной повторности окуляр-микрометром с переводом в микрометры. Препараты, приготовленные ручным способом, окрашивали метиленовой синью с последующим заклеиванием в глицерин-желатин.

Статистическая обработка полученных данных выполнена в программе OriginPro 7.5. Представлены среднеарифметические значения результатов измерений и их стандартные квадратические

отклонения. Достоверность различий между средними значениями каждой группы вычислялась с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA при уровне статистической значимости $p \leq 0,05$. Обсуждаются только статистически значимые различия.

Результаты и обсуждение

Морфологические и биохимические особенности листьев *L. tulipifera*. Размер и удельная плотность завершивших рост листьев тюльпанного дерева различаются в зависимости от условий местообитаний (табл. 1, табл. 2). Результаты расходятся с выводами, сделанными Б.Р. Васильевым с соавт. [20]: «изменчивость листа тюльпанного дерева низкая, что, возможно, связано с отсутствием метаморфоза листьев в чешуи и может служить показателем примитивности вида». Указанные авторы изучали изменчивость морфологических признаков метамеров в зависимости от расположения на побеге и от возраста дерева, а не в связи с условиями среды. Вероятно, в теплом влажном субтропическом климате не наблюдались изменения, выявленные нами в условиях высоких температур и инсоляции.

Таблица 2

Морфометрические характеристики листовой пластинки и содержание хлорофилла в листьях тюльпанного дерева в разных условиях освещенности

Параметры	Высокая освещенность	Затенение
Длина листовой пластинки, мм	131,67±9,45	162,64±14,88
Ширина листовой пластинки, мм	164,44±22,00	247,82±21,27
Удельная плотность листовой пластинки, мг/см ²	7,44±0,33	5,71±0,83
Содержание хлорофилла, мкг/см ²	36,46±0,20	25,25±1,56
Содержание хлорофилла, мг/г сух.веса	4,79±0,44	3,82±0,07
Содержание хлорофилла (измерения на SPAD-502 Plus)	44,63±2,96	36,09±0,96
Отношение Хл <i>a</i> / Хл <i>b</i>	2,53	2,18
Отношение Хл / Кар	3,40	2,72

Примечание: в таблице представлены средние результаты измерений в период с 10 по 20 августа 2017–2019 гг., город Ташкент; Хл – хлорофилл, Хл *a* – хлорофилл *a*, Хл *b* – хлорофилл *b*, Кар – каротиноиды.

Обнаружено, что теневые листья более тонкие и нежные, с крупной листовой пластинкой, длина их на 24–35% больше световых, а ширина – на 41–51% (табл. 2). Удельная плотность теневых листьев меньше на 13–16%. При этом общее содержание хлорофилла в единице поверхности или сухого веса теневых листьев достоверно ниже на 20–30%, чем у световых. Отношение содержания хлорофилла *a* к содержанию хлорофилла *b* у световых листьев примерно на 16% выше – значит, у деревьев в затенении листья содержат больше хлорофилла *b*, выполняющего светособирающую функцию. В теневых листьях на 20% меньше со-

держание каротиноидов, одна из функций которых — защита хлорофилла от повреждения светом.

Уменьшение плотности и толщины листа является известным общим ответом растения на низкую освещенность, способом увеличения площади улавливания света при сохранении биомассы. При этом в тонких листьях — более низкое содержание фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы, играющего важнейшую роль в фотосинтезе и фотодыхании, и меньшая площадь диффузионной поверхности мезофилла, а значит, низкая скорость фотосинтеза [8]. Однако ранее нам не удалось выявить достоверные различия в скорости видимого фотосинтеза листьев тюльпанных деревьев, произрастающих в хорошо освещенных местообитаниях и в притенении, хотя, даже при достаточном количестве воды и CO_2 , температуры $\geq 37^\circ\text{C}$ вызывали снижение скорости чистой продукции кислорода [16]. Напомним, что при водном дефиците в сочетании с интенсивным освещением происходит фотоингибирование — много света, недостаточно воды, невозможно открыть устьица для ассимиляции CO_2 , электрон-транспортная цепь хлоропластов не может высвобождать электроны на НАДФ, поскольку нет субстрата для восстановления, в итоге снижается фотосинтетическая активность. Полагаем, что повышенное содержание пигментов в световом листе дает возможность получать необходимое количество энергии в подобных условиях. Иными словами, сам процесс замедляется, но общий выход сохраняется на необходимом уровне за счет увеличения числа фотосинтезирующих единиц. С другой стороны, как отмечено в литературе, у более тонких листьев с малым количеством слоев клеток увеличивается улавливание света с единицы хлорофилла [8].

Анатомическое строение светового и теневого листа *L. tulipifera*. Эпидерма листьев представлена одним рядом клеток с толстым слоем кутикулы. Клетки верхней (адаксиальной) эпидермы крупнее, чем нижней (абаксиальной). В клетках эпидермы на обеих сторонах листа хорошо заметны ядра. Толщина наружной стенки эпидермы у световых листьев почти в 2 раза превышает аналогичный показатель у теневых. У световых листьев очертания эпидермальных клеток на парадермальном срезе прямолинейные, у теневых — с извилистыми антиклинальными стенками. Проекция эпидермальных клеток многоугольная. Количество клеток в единице поверхности эпидермальной ткани у светового листа больше, чем у теневого: на верхней стороне листовой пластинки больше на 8,5%, и на нижней стороне — на 24%. На обеих поверхностях световых и теневых листьев имеются трихомы, у световых листьев их больше.

Листья *L. tulipifera* гипостоматические — устьица находятся на абаксиальной стороне ли-

стовой пластинки и расположены поперечно к продольной оси листа. Устьица парацитного и гемипарацитного типа. Замыкающие клетки примерно одинаковой длины. Форма устьиц овальная. Устьица световых листьев крупные, погруженные. Устьица теневых листьев расположены вровень с эпидермальными клетками листа. В замыкающих клетках устьиц световых листьев содержатся отдельные хлоропласты. Число устьиц в единице поверхности светового листа на 82% превышает количество устьиц у теневого листа.

Мезофилл листа *L. tulipifera* на поперечном срезе дорсивентрального типа. Клетки палисадной и губчатой паренхимы — хлорофиллоносные. Губчатая паренхима световых листьев — с небольшими межклетниками, представлена 6–7 рядами округлых мелких клеток. Губчатая паренхима теневых листьев состоит из 4–5 рядов крупных клеток округлой формы с большими межклетниками. Палисадная паренхима световых листьев представлена двумя рядами крупных и удлиненных клеток, которые длиннее на 49% и шире на 29%, чем у теневых листьев. У световых листьев индекс палисадности — 2,18, у теневых — 1,9.

Между палисадными и губчатыми клетками паренхимы расположены немногочисленные выделительные ткани и многочисленные боковые проводящие пучки с мелкими сосудами, 3–4 сосуда в пучке у световых листьев и 2–3 — у теневых. Главная жилка листа выдается на абаксиальной стороне. Под адаксиальной эпидермой в ребрах листа располагается угловая колленхима: у светового листа 2–5-рядная, у теневого — 2–4-рядная. Над абаксиальной эпидермой в ребрах расположены клетки колленхимы (6–7 рядов клеток у светового листа, 3–4 ряда — у теневого). Остальная часть жилки занята основной паренхимой, в которую погружены 12 (световой лист) или 9 (теневой лист) проводящих пучков, клетки паренхимы светового листа толстостенные, у теневого листа — тонкостенные, многогранной формы. Проводящие пучки закрытые коллатеральные, у светового листа они состоят из 7 крупных и 5 мелких пучков, у теневого — из 6 крупных и 3 мелких пучков. Крупные и мелкие проводящие пучки чередуются между собой. Проводящие пучки склерифицированы, в них присутствуют механические ткани (склеренхимы). Среди клеток паренхимы у листьев обоих типов встречаются гидрочитные клетки. Сосуды ксилемы у световых листьев вытянутой формы, толстостенные, их стенки утолщены в виде спиралей или колец, у теневых — тонкостенные, округло-овальной формы.

Результаты измерения показателей строения светового и теневого листа представлены в табл. 3.

Таким образом, под влиянием высоких температур и сухости воздуха у листьев *L. tulipifera* в местообитаниях с высокой инсоляцией формируются ксероморфные признаки (согласно Д. Катлер

Таблица 3

Показатели анатомического строения листьев *Liriodendron tulipifera* в разных условиях освещенности (n=30)

Показатели		Высокая освещенность	Затенение
Эпидерма	толщина наружной стенки, мкм	7,14±0,06	3,33±0,03
	высота клеток, мкм	26,57±0,24	30,51±0,29
	число клеток на 1 мм ² адаксиальной поверхности листа	691,6±6,36	637,5±5,98
	число клеток на 1 мм ² абаксиальной поверхности листа	900,9±10,15	728,5±7,26
Устьица	длина, мкм	39,29±0,35	31,58±0,27
	ширина, мкм	21,43±0,18	13,16±0,09
	погруженность, мкм	13,89±0,08	—
	число на 1 мм ² адаксиальной поверхности листа	—	—
	число на 1 мм ² абаксиальной поверхности листа	182,5±1,88	100,1±0,94
Губчатая паренхима	толщина клетки, мкм	19,44±0,12	26,47±0,17
	число рядов клеток	6–7	4–5
Палисадная паренхима	длина клетки, мкм	46,64±0,41	31,25±0,29
	ширина клетки, мкм	21,43±0,19	16,67±0,13
	число рядов клеток	2	2
	индекс палисадности	2,18	1,9
Толщина гиподермы, мкм		23,21±0,21	28,33±0,26
Диаметр колленхимных клеток, мкм		24,92±0,22	20,59±0,19
Диаметр паренхимных клеток, мкм		47,23±0,41	56,25±0,54
Число проводящих пучков в главной жилке листа		12	9
Диаметр ксилемы в проводящих пучках, мкм		27,28±0,23	31,52±0,29

[7]): утолщенная кутикула, мелкие многочисленные эпидермальные клетки с утолщенными наружными стенками; погруженные многочисленные устьица, компактный мезофилл с маленькими межклеточными воздушными пространствами, рост количества и уменьшение размеров сосудов в проводящих пучках. В то же время, для листьев тюльпанных деревьев с затененных местобитаний, как для типичных мезофитов, характерны мезоморфные признаки: эпидермальные клетки крупные с тонкими наружными стенками; их очертания более извилистые и многоугольные; устьица непогруженные; крупноклеточная 4–5-рядная губчатая паренхима; короткая палисадная паренхима; крупные немногочисленные сосуды в проводящих пучках.

В целом наблюдаемые различия согласуются с данными литературы [7, 8], хотя некоторые — в частности, разница в содержании пигментов — не совпадают с классическими представлениями о гелиоморфной и сциоморфной структуре листа [5]. Полагаем, что это связано с усложнением реакции растения в ответ на сочетанное воздействие одновременно нескольких факторов — высокой инсоляции, температуры и сухости воздуха, каждый из которых способен вызывать структурные и биохимические изменения. К примеру, многорядность, мелкоклеточность, толстостенность клеток светового листа вполне могут быть защитной реакцией растения в ответ на действие высокой температуры, поскольку увеличивают теплоемкость листа, предохраняя от перегрева. Следует заметить, что разница температуры воздуха летом в течение суток в Ташкенте на освещенном участке обычно

достигает 15–25°C, а поверхность листа может нагреваться до +48–50°C. Очевидно, что даже при достаточном поливе есть прямая вероятность возникновения водного дефицита в тканях растения. Как результат приспособления к данным условиям, у листьев *L. tulipifera* в местообитаниях с высокой освещенностью и температурой формируются ксероморфные признаки, а в тени сохраняются мезоморфные. Большое количество крупных устьиц и проводящих пучков в жилке способствует охлаждению поверхности путем активного испарения воды (при достаточной водообеспеченности), а большая толщина клеточной стенки эпидермальных клеток, наличие толстой светоотражающей кутикулы и погруженность устьиц защищают лист от излишней пассивной потери влаги. Наши предположения подтверждаются измерениями: в августе на фоне одинакового содержания воды в тканях (68,18% и 67,91%) водоудерживающая способность у световых листьев была на 13% ниже (77,6% против 87,4%), чем у теневых.

Сочетание ксероморфных и мезоморфных признаков у листьев растений отмечалось в ряде исследований для представителей семейств Asteraceae [23], Poaceae [24] и Fabaceae [25]. Вероятно, это стало существенным фактором для колонизации ими различных местообитаний.

Таким образом, анализ морфологических и анатомических особенностей листьев *L. tulipifera* показал, что они обладают высокой экологической пластичностью. Данный вид хорошо приспособлен к разным световым условиям местообитания и высокой температуре, при этом в условиях сочетанного воздействия высокой инсоляции, темпе-

ратуры и сухости воздуха в ассимиляционных органах формируются ксероморфные изменения.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства инновационного развития Респу-

блики Узбекистан № БВ-М-Ф-5-001. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parks C.R., Miller N.G., Wendel J.F., McDougal K.M. Genetic divergence within the genus *Liriodendron* (Magnoliaceae) // Ann. Missouri Bot. Gard. 1983. Vol. 70. N 4. P. 658–666.
2. Yaghti A.A.Z., Movahedi A., Mohammadi K., Zhuge Q., Li H. The genetic diversity of *Liriodendron tulipifera* germplasm revealed by SSR markers // J. Biochem. Microb. Toxicol. 2018. Vol. 2. N 1: 1000105.
3. Ruban A.V. Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis // J. Exp. Bot. 2015. Vol. 66. N 1. P. 7–23.
4. Ueno M., Sae-Tang P., Kusama Y., Hihara Y., Matsuda M., Hasunuma T., Nishiyama Y. Moderate heat stress stimulates repair of photosystem II during photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Plant Cell Physiol. 2016. Vol. 57. N 11. P. 2417–2426.
5. Lambers H., Oliveira R.S. Plant physiological ecology. Cham: Springer, 2019. 736 pp.
6. Schulze E.-D., Beck E., Buchmann N., Clemens S., Muller-Hohenstein K., Scherer-Lorenzen M. Plant ecology. Berlin; Heidelberg: Springer, 2019. 926 pp.
7. Cutler D.F., Botha C.E.J., Stevenson D.W. Plant anatomy. An applied approach. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007. 312 pp.
8. Tosens T., Niinemets U., Vislap V., Eichelmann H., Castro-Diez P. Developmental changes in mesophyll diffusion conductance and photosynthetic capacity under different light and water availabilities in *Populus tremula*: how structure constrains function // Plant Cell Environ. 2012. Vol. 35. N 5. P. 839–856.
9. Abrams M.D., Kubiske M.E., Steiner K.C. Drought adaptations and responses in five genotypes of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh: photosynthesis, water relations and leaf morphology // Tree Physiol. 1990. Vol. 6. N 3. P. 305–315.
10. Kubiske M.E., Abrams M.D. Photosynthesis, water relations, and leaf morphology of xeric versus mesic *Quercus rubra* ecotypes in central Pennsylvania in relation to moisture stress // Can. J. For. Res. 1992. Vol. 22. N 9. P. 1402–1407.
11. Beck D.E. *Liriodendron tulipifera*. Yellow-Poplar. Magnoliaceae – Magnolia family // Silvics of North America: Hardwoods. Agriculture Handbook 654, vol. 2 / Eds. R.M. Burns and B.H. Honkala. Washington: United States Department of Agriculture, Forest Service, 1990. P. 406–416.
12. Busing R.T. Disturbance and the population dynamics of *Liriodendron tulipifera*: simulations with a spatial model of forest succession // J. Ecol. 1995. Vol. 83. N 1. P. 45–53.
13. Цхондзе Т., Чаидзе Ф., Концелидзе Н., Джакели Д. Биоэкология тюльпанных деревьев на Черноморском побережье Аджарии // Mod. Phytomorphol. 2013. Т. 4. С. 131–137.
14. Rivers M.C. *Liriodendron tulipifera*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T194015A2294401 [Электронный ресурс]. 2014. URL: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-3.RLTS.T194015A2294401.en> (дата обращения: 02.09.2019).
15. Rebbeck J., Scherzer A.J., Loats K.V. Foliar physiology of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) exposed to O₃ and elevated CO₂ over five seasons // Trees. 2004. Vol. 18. N 3. P. 253–263.
16. Акиншина Н.Г., Азизов А.А., Халмурзаева А.И. Биоэкологические особенности, чистая продукция и потребление кислорода *Liriodendron tulipifera* в условиях Ташкента // Субтропическое и декоративное садоводство: сб. науч. тр. № 71 / Под ред. А.В. Рындиной и др. Сочи: ФГБНУ ВНИИЦСК, 2019. С. 163–181.
17. Kim G. N., Han S.-H. Effects on growth, photosynthesis and pigment contents of *Liriodendron tulipifera* under elevated temperature and drought // KJ Agr. Forest Meteorol. 2015. Vol. 17. N 1. P. 75–84.
18. Ryang S.Z., Woo S.Y., Kwon S.Y., Kim S.H., Lee S.H., Kim K.N., Lee D.K. Changes of net photosynthesis, antioxidant enzyme activities, and antioxidant contents of *Liriodendron tulipifera* under elevated ozone // Photosynthetica. 2009. Vol. 47. N 1. P. 19–25.
19. Pellegrini E., Francini A., Lorenzini G., Nali C. PSII photochemistry and carboxylation efficiency in *Liriodendron tulipifera* under ozone exposure // Environ. Exp. Bot. 2011. Vol. 70. N 2–3. P. 217–226.
20. Васильев Б.Р., Гольцова Н.И., Колодяжный С.Ф. Некоторые закономерности строения годичного вегетативного побега *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae). Связь между морфологическими признаками метамеров закончившего рост побега // Бот. журн. 1980. Т. 65. № 3. С. 383–391.
21. Wettstein von D. Chrotyll – letal und der submicroscopische form wechsel der plastiden // Exp. Cell Res. 1957. Vol. 12. N 3. P. 427–433.
22. Evert R.F. Esau's plant anatomy, meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. Third edition. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2006. 601 pp.
23. Rivera P., Villaseñor J.L., Terrazas T. Meso- or xeromorphic? Foliar characters of Asteraceae in a xeric scrub of Mexico // Bot. Stud. 2017. Vol. 58. N 1: 12.
24. Abbas A., Bhatti K.H., Zehra S.S. Leaf xeromorphic adaptations in *Aeluropus lagopoides* from ecosystem of the Cholistan desert (Pakistan) // Fresenius Env. Bull. 2018. Vol. 27. N 1. P. 612–621.
25. Lysheide O.B. Xeromorphic features of three stem assimilants in relation to their ecology // Bot. J. Linnean Soc. 2008. Vol. 78. N 2. P. 85–98.

Поступила в редакцию 12.01.2020 г.

После доработки 04.08.2020 г.

Принята в печать 15.09.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Xeromorphic features of the leaves of *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae) in the arid climate of Central Asia

N.G. Akinshina^{1,*} , G.M. Duschanova², A.A. Azizov¹, A.I. Khalmurzaeva², K.N. Toderich³

¹M. Ulugbek National University of Uzbekistan, University st., 4, Tashkent, 100174, Uzbekistan;

²N.F. Rusanov Tashkent Botanic Garden, Academy of Science of the Republic of Uzbekistan, Bogishamol st., 232, Tashkent, 100140, Uzbekistan;

³International Platform for Dryland Research and Education, Tottori University, 1390 Hamasaka, Tottori-city, 680-0001, Japan

*e-mail: n.akinshina@yahoo.com

High irradiance of the habitat in arid areas is usually associated with high temperature and dry air, which can cause water scarcity in plants. The Tulip tree (*Liriodendron tulipifera*) is considered as a light-loving mesophytic species. This study showed that *L. tulipifera* forms shade or sun leaves depending on the lighting conditions. Some xeromorphic features were found in leaves of the trees in well-lit habitats. These sun leaves are smaller, denser and thicker, with smaller epidermal cells and a thick cuticle; the spongy parenchyma consists of a larger number of rows of small cells; the cells of the columnar parenchyma are larger, compared to the shade leaves. The sun leaf contains 20–30% more total chlorophyll, and the guard cells of the stomata of the sun leaf contain chloroplasts. Probably, the increased concentration of chlorophyll maintains the necessary level of energy balance in the conditions of inhibiting the photosynthesis process under high lightning and temperature. Decrease in the size of the sun leaf and epidermis cells, thickening of the cuticle and cell wall of epidermal cells, sunken stomata, compact mesophyll with small intercellular spaces, multi-row spongy parenchyma protect from overheating and passive loss of water; and can be considered as xeromorphic features. Large numerous stomata and vascular bundles contribute to effective cooling of the surface by transpiration at high temperatures under sufficient water supply. Thus, the leaves of *L. tulipifera* have an ecological plasticity in relation to light and temperature, which contributed to the acclimation of the species to the habitat conditions in arid climates.

Keywords: *Liriodendron tulipifera*, high solar illumination, shading, aridity, acclimation, xeromorphy

Сведения об авторах

Акиншина Наталья Геннадиевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела прикладной экологии и устойчивого развития Национального университета Узбекистана имени Мирзо Улугбека. Тел: 998-90-932-52-98; e-mail: n.akinshina@yahoo.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5968-6172>

Дусчанова Гулжан Мадримбаевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории анатомии и цитозембриологии Ташкентского ботанического сада имени академика Ф.Н. Русанова при институте Ботаники АН РУз. Тел: 998-90-943-49-16; e-mail: guljon.duschanova@mail.ru

Азизов Азамат Атакузиевич — канд. хим. наук, гл. научн. сотр., рук. отдела прикладной экологии и устойчивого развития Национального университета Узбекистана имени Мирзо Улугбека. Тел: 998-93-570-27-52; e-mail: azazizov@rambler.ru

Халмурзаева Атыргуль Исаковна — вед. специалист лаборатории интродукции древесных и травянистых растений Ташкентского ботанического сада имени академика Ф.Н. Русанова при институте Ботаники АН РУз. Тел: 998-90-538-06-55; e-mail: khalmurzaeva.atirgul@gmail.com

Тодерич Кристина Николаевна — докт. биол. наук, профессор Международной платформы по науке и образованию для засушливых земель Университета Тоттори. Тел: 81-(0)857-30-6332; e-mail: ktoderich@tottori-u.ac.jp

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.22

Роль вторичного окислительного стресса в бактерицидном действии антибиотиков

А.В. Ахова* , А.Г. Ткаченко *Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный исследовательский центр, УрО РАН, Россия, 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13***e-mail: akhovan@mail.ru*

Воздействие β -лактамов, фторхинолоновых и аминогликозидных антибиотиков вызывало усиление продукции пероксида водорода и активацию экспрессии генов защиты от окислительного стресса (OxyR-регулон) по принципу доза-эффект в клетках *Escherichia coli*. В условиях микроаэрации ослабление интенсивности вторичного окислительного стресса, вызванного воздействием антибиотика, за счет добавки антиоксиданта тиомочевина оказывало влияние на антибактериальную активность фторхинолонов. Добавка антиоксиданта потенцировала сублетальное (не вызывавшее снижение количества колониеобразующих единиц ниже уровня 10^3 /мл) действие антибиотика и повышала выживаемость бактериальных клеток, подвергнутых действию летальных доз. В присутствии антиоксиданта экспрессия генов OxyR-регулона, активированная сублетальным воздействием антибиотика, снижалась до уровня нестрессированной культуры. В условиях воздействия летальных доз антибиотика при добавке тиомочевина также наблюдалось снижение экспрессии генов антиоксидантной защиты, однако повышенный по сравнению с контролем уровень экспрессии сохранялся. Это может свидетельствовать о двойственной роли активных форм кислорода в условиях воздействия антибиотиков как повреждающих агентов, вносящих вклад в гибель клеток, и как сигнальных молекул, активирующих защитные механизмы.

Ключевые слова: активные формы кислорода, антибиотики, фторхинолоны, пероксид водорода, OxyR-регулон, каталаза

Одной из проблем современной медицины является снижение эффективности антибиотикотерапии бактериальных инфекций, обусловленное резким ростом числа резистентных форм микроорганизмов. Для ее решения ведется поиск соединений, обладающих новыми механизмами антибактериального действия, и факторов, усиливающих противомикробную активность известных препаратов, а также изучение механизмов формирования антибиотикостойчивости с целью предотвращения появления резистентных форм.

Ранее продемонстрировано появление маркеров развития окислительного стресса, таких как повышение внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК), активация систем антиоксидантной защиты или окислительное повреждение макромолекул в бактериальных клетках, подвергнутых действию различных антибактериальных препаратов [1, 2]. В связи с проблемой роста антибиотикорезистентности потенциальная вовлеченность АФК в бактерицидное действие антибиотиков привлекает особое внимание и широко обсуждается в течение последнего десятилетия. Предполагается, что возможно усилить антибактериальный эффект известных препаратов за счет потенцирования внутриклеточной продукции

АФК или ослабления систем антиоксидантной защиты бактерий.

Началом активного обсуждения данного вопроса послужила работа Коллинза с соавторами, в которой продемонстрировано увеличение продукции АФК в бактериальных клетках, подвергнутых воздействию бактерицидных антибиотиков, включая фторхинолоны, аминогликозиды и β -лактамы. Ослабление сопутствующего окислительного стресса при добавке антиоксидантов приводило к повышению выживаемости бактерий [3]. Это позволило группе Коллинза предположить, что гибель бактерий в результате воздействия бактерицидных антибиотиков обусловлена, наряду со специфическим воздействием препаратов на мишень, общим механизмом, основанным на окислительном повреждении компонентов клеток.

Несмотря на большое количество работ, посвященных данной теме, роль АФК в бактерицидном действии антибиотиков, в особенности в естественных условиях существования микроорганизмов, до сих пор остается предметом для дискуссии [4–6]. Принимая во внимание ограничения, присущие каждому из использованных в данных исследованиях методов, включая сравнительную оценку жизнеспособности бактерий

в аэробных и анаэробных условиях, при добавке химических антиоксидантов и в условиях наличия/отсутствия/сверхэкспрессии антиоксидантных генов [3, 7–9] можно сделать вывод о вовлеченности АФК в гибель клеток под действием антибиотиков, по крайней мере, в лабораторных условиях.

Как правило, вклад АФК в гибель бактерий под действием антибиотиков продемонстрирован на быстро растущих клетках, культивируемых в условиях высокой аэрации [3, 8, 9], в то время как для естественных мест обитания скорее характерны условия микроаэрации и медленный рост. Активация систем антиоксидантной защиты в условиях микроаэрации в ответ на воздействие антибиотиков [10], а также повышение в их присутствии уровня АФК в клетках из биопленки [11] позволяют предположить, что общий механизм окислительного повреждения может быть вовлечен в бактерицидное действие антибиотиков и в этих условиях.

В тоже время показано, что эндогенный окислительный стресс способствует формированию генетического разнообразия клеток в составе биопленки, что может расширять адаптивные возможности бактериальной популяции под действием антибиотиков [12]. Сходный вариант развития событий наблюдался при сублетальном воздействии антибиотиков [13]. Помимо мутагенного эффекта, АФК, активируя системы адаптивных ответов, могут выполнять также сигнальную функцию. У *Escherichia coli* основная часть антиоксидантных генов объединена в два регулона: SoxRS-регулон, экспрессия которого индуцируется в ответ на высокий уровень супероксидных анионов и воздействие редокс-циклирующих соединений, и OxyR-регулон, активирующийся в ответ на повышение концентрации пероксида водорода [14].

В качестве одного из доказательств вовлеченности АФК в бактерицидное действие антибиотиков в естественных условиях приводят факт повышения базового уровня экспрессии генов SoxRS-регулона у некоторых клинических изолятов энтеробактерий, резистентных к фторхинолонам [15]. Однако в данном случае, наряду с активностью антиоксидантных ферментов, свой вклад могут вносить механизмы ограничения транспорта антибиотиков в клетку и работа помп множественного лекарственного выброса, также находящиеся под контролем данного регулона. Кроме того, было обнаружено, что клинические изоляты *Acinetobacter baumannii*, характеризующиеся множественной лекарственной устойчивостью, проявляют повышенную активность каталазы, ответственной за разложение пероксида водорода [16].

Таким образом, роль АФК в бактерицидном действии антибиотиков не столь однозначна и зависит от условий, дозы препарата и состояния объекта.

В данной работе исследованы уровень продукции пероксида водорода и интенсивность экспрессии генов, входящих в OxyR-регулон, а также дана оценка вклада АФК в гибель клеток *E. coli*, подвергнутых действию β -лактамов, фторхинолоновых и аминогликозидных антибиотиков в условиях микроаэрации.

Материалы и методы

Микроорганизмы и условия культивирования.

В качестве объектов использованы штаммы *E. coli* BGF931 (MC4100 λ katG':lacZ) и BGF940 (MC4100 λ oxyR':lacZ), любезно предоставленные профессором Б. Демплом [17].

Клетки *E. coli*, сохраняемые на скошенном агаре LB («Sigma», США), переносили в пробирки с 5 мл бульона LB («Amresco», США) и культивировали 4–6 ч при 37°C без перемешивания. Затем бактериальные клетки переносили в соотношении 1:1000 в колбы Эрленмейера, содержащие 50 мл среды М9 с добавкой 0,4% глюкозы, и культивировали при 37°C с перемешиванием при 100 об./мин (термостатируемый шейкер 1092 («GFL», Германия)) в течение 14–16 ч. Ночную культуру разводили в свежей среде до оптической плотности $A_{600}=0,1$ и культивировали в описанных выше условиях. Исследуемые антибиотики добавляли по достижении культурой оптической плотности $A_{600}=0,3$ (рис. 1, 2).

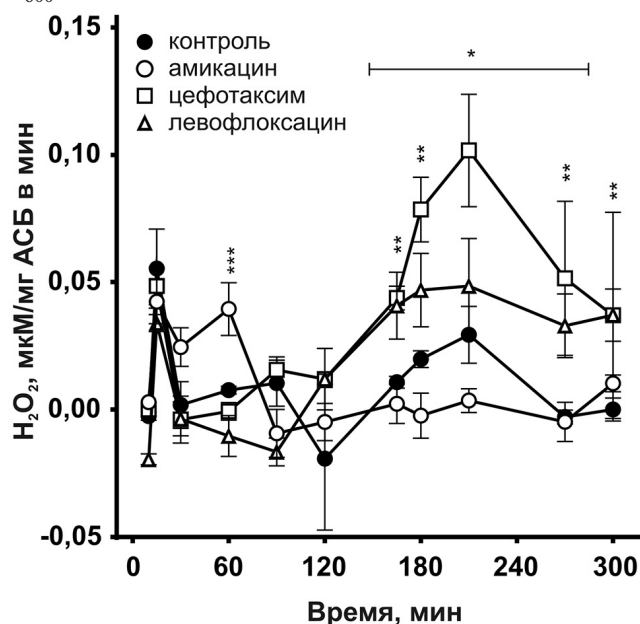


Рис. 1. Влияние антибиотиков на продукцию пероксида водорода клетками *E. coli* BGF931. Бактериальные клетки культивировали в отсутствие антибиотиков (контроль) и в присутствии 15 мкг/мл амикацина, 0,02 мкг/мл левофлоксацина или 3 мкг/мл цефотаксима. Данные представлены в формате среднее $\pm$ ошибка среднего. АСБ — абсолютно сухая биомасса. * — статистически значимое отличие культуры с добавкой цефотаксима от контроля; ** — статистически значимое отличие культуры с добавкой левофлоксацина от контроля; *** — статистически значимое отличие культуры с добавкой амикацина от контроля (t-критерий, $p < 0,05$).

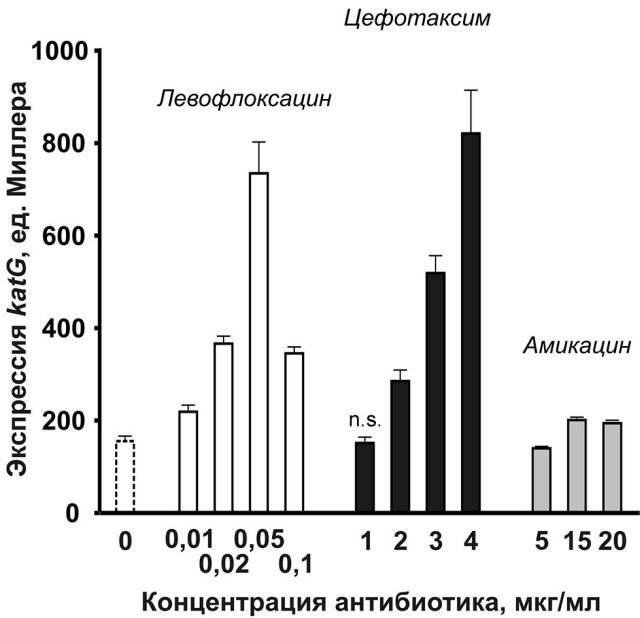


Рис. 2. Влияние антибиотиков на экспрессию гена *katG* в клетках *E. coli* BGF931. Уровень экспрессии определен на 4-й ч после внесения антибиотиков. Данные представлены в формате среднее $\pm$ ошибка среднего. n.s. — отсутствие статистически значимого отличия от контроля (t-критерий, $p < 0,05$).

В экспериментах по изучению влияния тиомочевины («Sigma», США) ночную культуру разводили в свежей среде М9 с добавкой 0,4 % глюкозы (50 мл) до оптической плотности $A_{600}=0,1$ и культивировали без перемешивания до достижения культурой $A_{600}=0,3$. Затем равные объемы культуры переносили в пробирки, содержащие тиомочевину/воду, в которые после 10 мин инкубации добавляли исследуемые антибиотики (конечный объем 5 мл). Пробирки инкубировали при 37°C без перемешивания (таблица).

Оптическую плотность бактериальных культур (A_{600}) измеряли по величине абсорбции при 600 нм с использованием спектрофотометра UV-1650PC («Shimadzu», Япония).

Экспрессия генов. Уровень экспрессии генов оценивали по активности β -галактозидазы в клетках, несущих слияние промотора исследуемого гена со структурной частью гена *lacZ*. Активность определяли в клетках, предварительно обработанных смесью додецилсульфата натрия и хлороформа, с добавкой орто-нитрофенил- β -галактопиранозиды («Sigma», США) в качестве субстрата [18].

Жизнеспособность бактерий. Готовили несколько последовательных разведений бактериальной культуры в физрастворе и высевали по 10 мкл суспензии клеток на агар LB в чашках Петри. Чашки инкубировали при 37°C 16–18 ч, после чего производили подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ).

Производство H_2O_2 бактериальными клетками. Для определения количества H_2O_2 в среде культивирования использовали флуоресцентный краситель Amplex red («Invitrogen», США) в реакции с пероксидазой хрена («Sigma», США). 0,5 мл культуры центрифугировали при 16000g 2 мин и супернатант замораживали. Реакцию воспроизводили в соответствии с рекомендациями производителя. Флуоресценцию (530/590 нм) измеряли с использованием мультимодального планшетного ридера Infinity M200 («Tecan», Швейцария).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», США). Оценка статистической значимости различий средних сравниваемых групп произведена с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Таблица

Влияние тиомочевины на экспрессию гена *oxyR* и восприимчивость *E. coli* к антибиотикам

Условия		lgКОЕ/мл [oxyR, ед. Миллера]								
		1			2			3		
		1 ч	4 ч	24 ч	1 ч	4 ч	24 ч	1 ч	4 ч	24 ч
Конт		8,00	8,34 [107]	8,49						
Конт	+ТМ	8,00	8,17 [90]	8,39						
ЛФЦ		7,68	6,53 [186]	6,24	6,62	3,46 [270]	5,81	5,12	3,52 [632]	1,33
ЛФЦ	+ТМ	7,49	5,90 [93]	6,20	6,95	4,02 [138]	3,94	4,97	3,98 [292]	2,54
ЦФТ		8,01	7,48 [217]	4,95	7,34	5,07 [1293]	2,04	6,98	3,96 [868]	0,7
ЦФТ	+ТМ	7,84	7,17 [230]	3,63	7,36	4,82 [800]	1,44	7,48	4,21 [1109]	0
АМЦ		7,82	7,63 [86]	6,58	7,69	6,22 [80]	3,10	7,47	3,72 [69]	0
АМЦ	+ТМ	7,70	7,28 [62]	5,81	7,51	5,38 [67]	3,44	7,28	3,96 [61]	0

Данные представлены в виде среднего, рассчитанного по совокупности результатов не менее трех отдельных экспериментов. Конт (контроль) — культура без добавки антибиотика; ЛФЦ — культура с добавкой 0,01 (1), 0,1 (2) и 0,3 (3) мкг/мл левофлоксацина; ЦФТ — добавка 0,5 (1), 2,0 (2) и 5,0 (3) мкг/мл цефотаксима; АМЦ — добавка 20 (1), 40 (2) и 60 (3) мкг/мл амикацина; +ТМ — добавка 50 мМ тиомочевины. Жирным шрифтом обозначены статистически значимые отличия от культуры без добавки тиомочевины (t-критерий, $p < 0,05$).

Результаты

Воздействие антибиотиков вызывает повышение продукции пероксида водорода и уровня экспрессии гена *katG* в бактериальных клетках. В культурах *E. coli*, подвергнутых сублетальному воздействию β -лактамов, фторхинолоновых и аминогликозидных антибиотиков, изучены маркеры развития окислительного стресса, включая экспрессию генов, входящих в ОхуR-регулон, и количество пероксида водорода в среде культивирования. Как известно, действие β -лактамов (цефотаксим) направлено на процесс синтеза клеточной стенки, фторхинолонов (левофлоксацин) — на синтез и целостность ДНК, тогда как аминогликозиды (амикацин) ингибируют синтез белка. Кроме того, в качестве общего механизма антибактериального действия для всех трех групп антибиотиков рассматривается окисление компонентов бактериальной клетки в результате повышения продукции АФК [3]. Под сублетальными дозами антибиотиков (сублетальное воздействие) понимаются концентрации антибиотиков, воздействие которых на бактериальную культуру не приводило к гибели всех клеток (в частности, к снижению оптической плотности культуры по сравнению со стартовой точкой в момент добавки антибиотика и/или падению количества КОЕ ниже уровня 10^3 /мл). В последующих экспериментах также применялись ингибиторные дозы, под действием которых количество КОЕ в культуре сохранялось на том же уровне, что и в момент внесения антибиотика, и летальные — вызывавшие падение количества КОЕ ниже 10^3 /мл.

По мере увеличения плотности периодической культуры *E. coli* в отсутствие антибиотиков (контрольные условия) происходило накопление H_2O_2 в среде культивирования, что сопровождалось повышением примерно на 15% уровня экспрессии гена *katG*, кодирующего каталазу, которая катализирует разложение пероксида водорода. Увеличение экспрессии *katG* регистрировалось после того, как концентрация H_2O_2 в среде превышала 0,1 мкМ. Дальнейший рост концентрации H_2O_2 (до 0,7 мкМ) не сопровождался увеличением экспрессии гена. С замедлением скорости роста культуры по мере приближения к переходу в стационарную фазу концентрация H_2O_2 в среде стабилизировалась, а экспрессия *katG* снижалась до начального уровня. Увеличение концентрации H_2O_2 в среде по мере роста культуры могло быть связано с увеличением плотности популяции, а не с увеличением продукции АФК в бактериальных клетках. Чтобы исключить этот момент при оценке образования АФК клетками под действием антибиотиков, была рассчитана скорость продукции H_2O_2 с учетом показателей биомассы.

После 90 мин воздействия β -лактамов и фторхинолоновых антибиотиков количество

H_2O_2 в среде превысило 0,1 мкМ, в то время как в культуре, подвергнутой действию аминогликозида, этот предел не был перейден за все время наблюдения. Тем не менее, в первый час воздействия амикацина уровень продукции АФК был в 5–10 раз выше по сравнению с контролем (рис. 1). Значительное увеличение уровня продукции H_2O_2 клетками, подвергнутыми воздействию β -лактама и фторхинолона, наблюдалось через 2 ч после внесения антибиотика (рис. 1).

Сублетальное воздействие фторхинолона левофлоксацина и β -лактама цефотаксима вызывало повышение экспрессии гена *katG* по принципу доза-эффект, хотя по достижении определенного порога наблюдалось снижение стимулирующего эффекта (рис. 2). Увеличение уровня экспрессии генов ОхуR-регулона антиоксидантной защиты происходило как при культивировании в условиях более интенсивной аэрации (культивирование с перемешиванием) (рис. 2), так и в условиях микроаэрации (без перемешивания) (таблица). Сравнительно более низкие дозы амикацина (5 мкг/мл) вызывали понижение уровня экспрессии гена *katG* относительно контроля, а небольшое превышение контрольного уровня, наблюдаемое при воздействии более высоких концентраций, обусловлено, скорее, снижением генной экспрессии по мере роста культуры в отсутствие антибактериальных препаратов, чем увеличением экспрессии под действием антибиотика (рис. 2).

Снижение интенсивности вторичного окислительного стресса за счет добавки антиоксиданта тиомочевина изменяет восприимчивость *E. coli* к фторхинолону. Одним из подходов к оценке вовлеченности АФК в антибактериальное действие является сравнение чувствительности бактериальных клеток к антибиотику в присутствии и в отсутствие антиоксиданта. Поскольку данное исследование сфокусировано на пероксидном окислительном стрессе, в качестве антиоксиданта была выбрана тиомочевина, способная нейтрализовать H_2O_2 [19]. Кроме того, именно тиомочевина применялась в предшествующих работах, посвященных выявлению роли АФК в бактерицидном действии антибиотиков [3, 4].

В предварительных экспериментах нами была подобрана концентрация тиомочевина, достаточная для нейтрализации летального действия экзогенного пероксида водорода (6 мМ), но не оказывающая влияния на скорость роста и количество КОЕ при культивировании в контрольных условиях. В условиях микроаэрации добавка тиомочевина изменяла восприимчивость *E. coli* к фторхинолонам, но не оказывала статистически значимого влияния на антибактериальное действие β -лактама и аминогликозида (таблица). Антиоксидант не оказывал влияния на ингибиторное действие фторхинолона, усиливал субле-

тальное воздействие и снижал эффект летальных доз антибиотика.

Наряду с влиянием на жизнеспособность бактериальных клеток, добавка тиомочевины оказывала влияние на уровень экспрессии генов защиты от окислительного стресса *OxyR*-регулона. Антиоксидантный эффект тиомочевины проявлялся в снижении экспрессии гена *oxyR*, активированной воздействием антибиотика (таблица).

Обсуждение результатов

В данной работе показано, что в условиях аэрации средней интенсивности и микроаэрации в бактериальных клетках, подвергнутых действию антибиотиков, происходит усиление внутриклеточной продукции H_2O_2 . В случае воздействия фторхинолона левофлоксацина и β -лактама цефотаксима повышенный уровень продукции пероксида водорода сохранялся на протяжении всего времени наблюдения и сопровождался активацией экспрессии генов, входящих в *OxyR*-регулон (рис. 1, 2). Полученные нами результаты отличаются от опубликованных ранее данных, свидетельствующих о том, что воздействие β -лактама ампициллина и фторхинолона норфлоксацина не вызывает накопление H_2O_2 в количестве, достаточном для активации *OxyR*-регулона [4]. Расхождение результатов может быть связано как с ограничением времени наблюдения в цитируемой работе до двух часов, так и с различием условий культивирования, в том числе более высокими интенсивностью аэрации и скоростью гибели клеток по сравнению с этими показателями в наших экспериментах.

Вовлеченность эндогенных АФК в бактерицидное действие антибиотиков можно оценить с помощью антиоксидантов. Предполагается, что, если продукция АФК вносит вклад в гибель клеток под действием антибиотиков, антиоксидант, нейтрализуя АФК, будет способствовать повышению жизнеспособности бактерий. В данной работе в качестве антиоксиданта использована тиомочевина, основой антиоксидантного действия которой является способность нейтрализовать пероксид водорода [19]. Также показано, что тиомочевина может снижать продукцию гидроксильного радикала *in vitro* и *in vivo* [3, 20], что может быть связано с ее способностью взаимодействовать с H_2O_2 , который является субстратом в реакции Фентона, продуцирующей гидроксильные радикалы. Кроме того, продемонстрирована способность тиомочевины нейтрализовать супероксидные анионы [21].

В отличие от подходов, использованных в ранее опубликованных работах, наши эксперименты по изучению влияния тиомочевины на восприимчивость *E. coli* к антибиотикам проводились в условиях микроаэрации, близких

к условиям естественных мест обитания данных бактерий, где они подвергаются воздействию антибиотиков. Защитный эффект тиомочевины наблюдался только на клетках, подвергнутых действию фторхинолонового антибиотика (таблица). Ранее было показано, что в условиях интенсивной аэрации добавка тиомочевины защищает бактериальные клетки от воздействия летальных доз как фторхинолонов, так и β -лактамов и аминогликозидов [3]. Это можно расценивать как подтверждение того, что вклад вторичного окислительного стресса в антибактериальное действие пропорционален доступности кислорода (интенсивности аэрации среды). Последнее справедливо как для антибактериальных препаратов, так и других стрессорных воздействий [22]. Кроме того, можно предположить, что из трех исследованных групп антибиотиков наибольший вклад продукция АФК вносит в антибактериальное действие фторхинолонов.

Следует отметить, что эффект тиомочевины зависел от концентрации (силы антибактериального воздействия) антибиотика. Антиоксидант не оказывал влияния на ингибиторное действие антибиотика, усиливал сублетальное и снижал его летальное воздействие. Измерение уровня генной экспрессии в этих условиях показало, что внесение тиомочевины снижает отклик системы антиоксидантной защиты (*OxyR*-регулон), активированной в ответ на добавку антибиотика (таблица). Если в случае сублетального воздействия средней силы экспрессия *oxyR* при добавке тиомочевины снижалась почти до контрольного уровня, то в клетках, подвергнутых действию антибиотика в более высоких дозах, экспрессия антиоксидантного регулона оставалась на сравнительно высоком уровне. Это свидетельствует о важной роли активации *OxyR*-регулона в защите бактериальных клеток от вторичного окислительного стресса, вызванного воздействием антибиотика. Кроме того, полученные результаты могут быть интерпретированы как свидетельство не только повреждающей активности, но и сигнальной роли АФК в стрессовых условиях. При этом такая роль не ограничивается активацией систем защиты от окислительного стресса, но также может распространяться на регулятор общего стрессового ответа *rpoS*, помпы множественного лекарственного выброса, регуляцию проницаемости клеточной стенки и др. [23–25].

Таким образом, АФК, накопление которых сопровождает воздействие β -лактамов, аминогликозидных и фторхинолоновых антибиотиков, в условиях микроаэрации оказывают влияние на антибактериальный эффект только фторхинолонов. Снижение интенсивности вторичного окислительного стресса и, соответственно, отклика систем антиоксидантной защиты за счет добавки антиоксиданта тиомочевины усиливает сублеталь-

ное воздействие антибиотика и снижает эффективность его летальных доз.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Брюсу Демплу (Stony Brook University Medical School, Stony Brook, N.Y.) за предоставленные штаммы *E. coli*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albasa I., Becerra M., Battán P., Páez P. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 317. N 2. P. 605–609.
2. Becerra M., Paez P., Larovere L., Albasa I. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin // Mol. Cell. Biochem. 2006. Vol. 285. N 1–2. P. 29–34.
3. Kohanski M., Dwyer D., Hayete B., Lawrence C., Collins J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // Cell. 2007. Vol. 130. N 5. P. 797–810.
4. Liu Y., Imlay J. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species // Science. 2013. Vol. 339. N 6124. P. 1210–1213.
5. Van Acker H., Coenye T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria // Trends Microbiol. 2017. Vol. 25. N 6. P. 456–466.
6. Hong Y., Zeng J., Wang X., Drlica K., Zhao X. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2019. Vol. 116. N 20. P. 10064–10071.
7. Goswami M., Mangoli S., Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. Vol. 50. N 3. P. 949–954.
8. Wang X., Zhao X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. Vol. 53. N 4. P. 1395–1402.
9. Dwyer D., Belenky P., Yang J., et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014. Vol. 111. N 20. P. 2100–2109.
10. Akhova A., Tkachenko A. ATP/ADP alteration as a sign of the oxidative stress development in *Escherichia coli* cells under antibiotic treatment // FEMS Microbiol. Lett. 2014. Vol. 353. N 1. P. 69–76.
11. Battan P., Barnes A., Albasa I. Resistance to oxidative stress caused by ceftazidime and piperacillin in a biofilm of *Pseudomonas* // Luminescence. 2004. Vol. 19. N 5. P. 265–70.
12. Boles B., Singh P. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. Vol. 105. N 34. P. 12503–12508.
13. Kohanski M., DePristo M., Collins J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis // Mol. Cell. 2010. Vol. 37. N. 3. P. 311–320.
14. Imlay J. Pathways of oxidative damage // Annu. Rev. Microbiol. 2003. Vol. 57. P. 395–418.
15. Koutsolioutsou A., Peña-Llopis S., Demple B. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. Vol. 49. N. 7. P. 2746–2752.
16. Sato Y., Unno Y., Miyazaki C., Ubagai T., Ono Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* resists reactive oxygen species and survives in macrophages // Sci. Rep. 2019. Vol. 9. N 1: 17462.
17. Ding H., Demple B. In vivo kinetics of a redox-regulated transcriptional switch // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997. Vol. 94. N 16. P. 8445–8449.
18. Miller J.H. Experiments in molecular genetics. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 466 pp.
19. Randall L. Reaction of thiol compounds with peroxidase and hydrogen peroxide // J. Biol. Chem. 1946. Vol. 164. N 2. P. 521–527.
20. Anbar M., Neta P. A compilation of specific bimolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution // Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1967. Vol. 18. N 7. P. 493–523.
21. Kelner M., Bagnell R., Welch K. Thioureas react with superoxide radicals to yield a sulfhydryl compound. Explanation for protective effect against paraquat // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. N 3. P. 1306–1311.
22. Mols M., Pier I., Zwietering M., Abee T. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus* // Int. J. Food Microbiol. 2009. Vol. 135. N 3. P. 303–311.
23. Fraud S., Poole K. Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. Vol. 55. N 3. P. 1068–1074.
24. Wang X., Kim Y., Hong S., Ma Q., Brown B., Pu M., Tarone A., Benedik M., Peti W., Page R., Wood T. Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response // Nat. Chem. Biol. 2011. Vol. 7. N 6. P. 359–366.
25. Tkachenko A. Stress responses of bacterial cells as mechanism of development of antibiotic tolerance // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. Vol. 54. N 2. P. 108–127.

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.

После доработки 28.08.2020 г.

Принята в печать 29.09.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Role of secondary oxidative stress in the bactericidal action of antibiotics

A.V. Akhova* , A.G. Tkachenko 

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Golev st. 13, Perm, 614081, Russia*

**e-mail: akhovan@mail.ru*

Exposure to β -lactam, fluoroquinolone and aminoglycoside antibiotics caused an increase in the production of hydrogen peroxide and the expression of OxyR-regulon of the oxidative stress response in *Escherichia coli* cells. Under the conditions of microaeration, the attenuation of secondary oxidative stress due to the addition of an antioxidant thiourea affected the antibacterial effect of fluoroquinolones. Thiourea potentiated the effect of sub-lethal (which did not reduce the number of colony-forming units below 10^3 /mL) doses of the antibiotic and increased the viability of cells exposed to lethal doses. The addition of thiourea reduced the expression of OxyR-regulon, increased by the sub-lethal antibiotic action, to an antibiotic-free culture level. When exposed to lethal doses, a decrease in the antibiotic-mediated expression of oxidative stress response genes in the presence of thiourea was also observed, however, the expression level remained higher as compared to an antibiotic-free culture. This may indicate the dual role of ROS under antibiotic treatment as the damaging agents contributing to killing and the signal molecules activating stress responses.

Keywords: *reactive oxygen species, antibiotic, fluoroquinolones, hydrogen peroxide, OxyR-regulon, catalase*

Сведения об авторах

Ахова Анна Викторовна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН. Тел.: 8-342-212-2159; e-mail: akhovan@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3477-750X>

Ткаченко Александр Георгиевич — докт. мед. наук, зав. лабораторией адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН. Тел.: 8-342-212-2159; e-mail: agtkachenko@iegmr.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8631-8583>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.65

Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, доставленных с международной космической станции**Р.Р. Еникеев^{*} , Н.Ю. Татарина , Л.М. Захарчук ***Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;***e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com*

Российский сегмент Международной космической станции, как закрытая среда обитания, является благоприятной средой для развития микроорганизмов. Там встречаются бактерии и грибы разных систематических групп, некоторые из которых могут приводить к возникновению инфекций. Так, опасность представляют отдельные виды спорообразующих бактерий рода *Bacillus*. У семи штаммов бактерий этого рода, выделенных из проб, полученных на станции, определена устойчивость к таким β-лактамам антибиотикам, как пенициллин, ампициллин, меропенем, ряду производных цефалоспоринов I-го (цефазолин), II-го (цефуроксим), III-го (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим), IV-го (цефепим) поколений, а также аминоциклитолному антибиотику спектиномицину. Установлено, что все эти штаммы устойчивы к пенициллину и ампициллину со значением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) от 16 до 2048 мкг/мл, а также к антибиотикам цефалоспоринового ряда и меропенему со значением МИК от 2 до 2048 мкг/мл. Резистентность бактерий к спектиномицину, применяемому у пациентов с аллергией на β-лактамы пенициллины и цефалоспорины, находится в диапазоне МИК от 32 до 2048 мкг/мл. Отсутствие активных эффлюкс-насосов у *B. licheniformis* 7-12 с высокими значениями МИК к пенициллину и ампициллину, позволило предположить наличие у этого штамма механизма β-лактамазной защиты от этих антибиотиков. Еще у трех штаммов, устойчивых к пенициллину и ампициллину (*B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21, *Bacillus* sp. НЕР3В2) функционирует другой механизм защиты — активный транспорт антибиотика из клетки, опосредованный наличием эффлюкс-насосов, функционирующих за счет электрохимического потенциала клеточной мембраны. Показано, что у шести штаммов исследованных бацилл резистентность к производным цефалоспоринов III-IV-го поколений цефтриаксону, цефтазидиму, цефепиму и аминоциклитолному антибиотику спектиномицину также очевидно обеспечивается системами активного оттока ксенобиотиков, относящимися к группе второстепенных транспортеров.

Ключевые слова: *Российский сегмент Международной космической станции, бактерии рода *Bacillus*, устойчивость к антибиотикам, минимальная ингибирующая концентрация, эффлюкс-насосы, замкнутая среда обитания*

Российский сегмент Международной космической станции (РС МКС) представляет собой уникальную замкнутую среду обитания, которая отличается постоянной температурой (около 22°C), повышенной влажностью, более высокими, чем на Земле, уровнями космического излучения и углекислого газа, наличием доступных органических субстратов, микрогравитацией и постоянным проживанием людей. Совокупность этих условий является благоприятной средой для развития микроорганизмов [1]. Наряду с различными видами грибов на РС МКС встречаются и прокариоты различных систематических групп [2]. Грибы и бактерии, обитающие на борту МКС, могут нарушать работу систем жизнеобеспечения, представлять опасность для здоровья космонавтов

и вызывать коррозию оборудования, поэтому на пилотируемых космических аппаратах большое внимание уделяется постоянному мониторингу состава микробных сообществ [3]. Причиной микробной контаминации РС МКС является смена экипажей, осуществление доставки с Земли заменяемого оборудования и расходных материалов, а также использование систем, обеспечивающих регенерацию продуктов жизнедеятельности людей на орбите. Большинство микроорганизмов, обнаруженных на борту РС МКС, связаны с человеком, а микробиом РС МКС напоминает микробиом некоторых замкнутых помещений на Земле [4–5] и может содержать условно-патогенные микроорганизмы [2, 6, 7]. Некоторые виды бактерий могут приводить к воз-

никновению инфекций. Особенную опасность представляют спорообразующие бактерии, в частности — представители рода *Bacillus*, которые могут долгое время выживать в окружающей среде при низком содержании влаги и питательных веществ [8]. Постоянное наблюдение за микробиомом на РС МКС позволяет оценить факторы риска для здоровья экипажа, целостности МКС и функционирования ее систем. Так, Национальное управление по аэронавтике и исследованию космического пространства США (НАСА) определило, что исследование микробиома Международной космической станции (МКС) является основной целью текущих и будущих исследований на орбите [1].

Целью настоящей работы было изучение устойчивости штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из проб, доставленных из РС МКС, к ряду клинически значимых антибиотиков и определение возможных механизмов этой устойчивости.

Материалы и методы

В работе использовали бактерии рода *Bacillus* — *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12, *B. subtilis* 14-12, выделенные из образцов, доставленных из РС МКС в 2012–2014 гг. и идентифицированные до вида с применением молекулярных методов [3], а также бактерии, выделенные и идентифицированные нами в настоящей работе из образцов, доставленных из РС МКС в 2018 г. Для сравнительного изучения были использованы штаммы трех видов бактерий рода *Bacillus* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ: *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, *B. pumilus* КМ-МГУ 364 и *B. subtilis* КМ-МГУ 25.

Идентификацию бактерий, выделенных в 2018 г., осуществляли путем анализа генов 16S рРНК [9]. Выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных на жидкой среде с мяско-пептонным бульоном (МПБ) с 1% глюкозы, проводили с помощью комплекта реактивов Genomic DNA Purification Kit КО 512 (Thermo Scientific, США) по методике, рекомендуемой разработчиками этого комплекта реактивов. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров (Синтол, Россия) B63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3) и B1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Полученные фрагменты ДНК разделяли в агарозном геле с помощью электрофореза (120 В). Агарозный гель готовили, добавляя агарозу (1–1,2%) в 1х трис-ацетатный (ТАЕ) буфер, нагревали до 90–95°C, перемешивали до полного растворения агарозы, добавляли 7,5 мкл раствора бромистого этидия на каждые 150 мл раствора, охлаждали до 45–50°C и заливали в специальную форму. После полимеризации гель переносили в электрофорезную горизонтальную ка-

меру Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США). В образцы с фрагментами ДНК добавляли буфер в объеме 1:5. Электрофоретическое разделение проводили в буфере 1х ТАЕ. Фрагменты нуклеиновых кислот определяли в УФ-свете. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (Thermo Scientific, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Thermo Scientific, США).

Определение значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков (МИК) проводили методом их последовательных двукратных разведений с использованием 96-луночных планшетов (Eppendorf, Германия). Для этого выращивали суточную культуру бактерий в МПБ с 1% глюкозы до оптической плотности 1,0 (OD 600 нм), после чего культуру клеток разбавляли средой МПБ до оптической плотности 0,1 (OD 600 нм) и вносили в лунки. Затем в лунки вносили антибиотик таким образом, чтобы его концентрация в первой лунке составляла 4096 мкг/мл с последующим двукратным разведением до концентрации 2 мкг/мл. В работе использовали 9 β-лактамовых антибиотиков и аминоциклитольный антибиотик спектиномицин. Рост бактерий оценивали, добавляя в лунки резазурин (Sigma, США) до концентрации 50 мкМ [10].

Для оценки активности эффлюкс-систем в 96-луночный планшет вносили питательную среду и соответствующий антибиотик в концентрации от 4096 до 2 мкг/мл, как описано выше, а затем в каждую лунку добавляли протонофор — карбонил-цианид-3-хлорфенилгидразон (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, СССР, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. В качестве контролей использовали лунки с антибиотиком, но без добавления СССР и лунки, содержащие только питательную среду с культурой и СССР. Планшеты инкубировали в течение суток при 37°C. О влиянии СССР на рост судили, добавляя резазурин в концентрации 50 мкМ [10]. Все опыты проводили в трехкратной повторности. Активность эффлюкса определяли по отношению кратности уменьшения (КУ) МИК антибиотиков в культурах без СССР к значениям МИК при его добавлении. При величине КУ < 4 регистрировали отсутствие эффлюкса, при КУ в диапазоне от 4 до 16 отмечали его умеренную активность, а при КУ > 16 фиксировали высокую активность [11].

Результаты и обсуждение

Идентификация культур. В ходе настоящей работы были использованы штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные ранее и идентифицированные до вида [3], а также новые штаммы спорообразующих бактерий, выделенных из проб, полу-

ченных из РС МКС и идентифицированных нами уже в ходе настоящей работы. Все четыре новых исследованных штамма на основании анализа последовательностей 16S рРНК были отнесены к роду *Bacillus* и обозначены как штаммы PWN2D, DLA64, LR2HG21 и НЕР3В2. Так как последовательности гена 16S рРНК исследуемых штаммов оказались одновременно близки к нескольким видам рода *Bacillus*, то их не удалось однозначно отнести к конкретному виду.

Определение МИК. Изучена устойчивость штаммов бактерий рода *Bacillus*, полученных из РС МКС, к ряду клинически значимых антибиотиков, действующих на грамположительные бактерии. В качестве культур для сравнения исследовались некоторые штаммы бацилл, полученные из музея кафедры микробиологии МГУ. Проанализирована устойчивость исследуемых штаммов к таким β -лактамным антибиотикам, как пенициллин, ампициллин, меропенем, производным цефалоспоринов I-го (цефазолин), II-го (цефуроксим), III-го (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим) и IV-го (цефепим) поколений, а также аминоциклитолному антибиотику спектиномицину (табл. 1). Благодаря высокой эффективности действия, низкой токсичности и наличию разработанных технологий получения β -лактамы антибиотики нашли наиболее широкое применение в современной медицине. Спектиномицин является единственным в ряду использованных нами антибиотиков, не относящийся к β -лактамам. Его часто назначают в качестве резервного препарата для пациентов, которых нельзя лечить цефалоспорином третьего и четвертого поколений.

Штамм *B. licheniformis* 7-12, выделенный из РС МКС, показал очень высокую устойчивость к пенициллину, ампициллину и цефтриаксону — 1024 мкг/мл (табл. 1). Высокая резистентность была обнаружена у этого штамма также ко всем другим изученным антибиотикам. Штамм *B. licheniformis* КМ-МГУ 14 из коллекции кафедры микробиологии МГУ показал наличие устойчиво-

сти только к пенициллину, ампициллину и спектиномицину с МИК 128, 256 и 256 мкг/мл соответственно.

Штамм *B. pumilus* 8-12 также показал очень высокую устойчивость ко всем исследуемым антибиотикам, причем особенно высокие значения были получены при использовании ампициллина и цефтазида — МИК 2048 мкг/мл (табл. 1). Высокая резистентность показана также к цефоперазону и цефепиму с МИК 1024 мкг/мл. Наиболее эффективными ингибиторами показали себя цефуроксим и цефтриаксон с МИК 64 и 128 мкг/мл, являющиеся цефалоспорином II-го и III-го поколения, и меропенем с МИК 16 мкг/мл (табл. 1). Штамм *B. pumilus* КМ-МГУ 364, подобно *B. pumilus* 8-12, показал высокую устойчивость в отношении цефтазида и цефепима — 1024 и 512 мкг/мл соответственно, но, по сравнению со штаммом 8-12, устойчивость штамма КМ-МГУ 364 была ниже ко всем исследованным антибиотикам, особенно к пенициллину, ампициллину и цефоперазону (табл. 1). Штамм *B. subtilis* 14-12 показал значительную устойчивость только к четырем исследуемым антибиотикам — пенициллину, ампициллину, цефуроксиму и спектиномицину — со значениями МИК 2048, 2048, 16 и 32 мкг/мл соответственно (табл. 1). Устойчивость к антибиотикам цефалоспоринового ряда, причем практически всех поколений, у *B. subtilis* 14-12 была низкой. Штамм *B. subtilis* КМ-МГУ 25 показал сходную с *B. subtilis* 14-12 картину резистентности (табл. 1) за исключением более высокой устойчивости к спектиномицину, МИК которого составила 2048 мкг/мл.

Из четырех выделенных и идентифицированных в ходе данной работы штаммов бактерий рода *Bacillus* максимальные значения МИК для изученных антибиотиков показал штамм *Bacillus* sp. НЕР3В2 (табл. 1). Штамм был устойчив ко всем исследуемым антибиотикам, причем не только к пенициллину и ампициллину, но и к цефалоспорином I-го и III-го поколений — цефазолину и цефтриаксону, а также меропенему с уровнем

Таблица 1

Минимальная ингибирующая концентрация антибиотиков (мкг/мл) у штаммов бактерий рода *Bacillus*

Штамм	Пенициллин	Ампициллин	Цефазолин	Цефуроксим	Цефтриаксон	Цефоперазон	Цефтазидим	Цефепим	Меропенем	Спектиномицин
<i>B. licheniformis</i> 7-12	1024	1024	128	64	1024	512	128	128	16	512
<i>B. licheniformis</i> КМ-МГУ 14	128	256	4	16	2	2	4	2	4	256
<i>B. pumilus</i> 8-12	256	2048	256	64	128	1024	2048	1024	16	256
<i>B. pumilus</i> КМ-МГУ 364	16	64	32	8	64	32	1024	512	8	64
<i>B. subtilis</i> 14-12	2048	2048	2	16	2	4	4	2	2	32
<i>B. subtilis</i> КМ-МГУ 25	2048	2048	2	—	2	4	4	2	—	2048
<i>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	1024	512	1024	128	1024	16	128	128	1024	256
<i>Bacillus</i> sp. PWN2D	256	256	2	32	2	2	2	2	4	256
<i>Bacillus</i> sp. DLA64	256	256	2	32	2	2	2	2	4	256
<i>Bacillus</i> sp. LR2HG21	512	2048	2	1024	16	16	512	64	1024	512

Примечание: «—» — минимальную ингибирующую концентрацию для этих антибиотиков не определяли

МИК 1024 мкг/мл (табл. 1). Штаммы *Bacillus* sp. PWN2D и *Bacillus* sp. DLA64 показали одинаковые значения МИК ко всем исследуемым антибиотикам (табл. 1). Оба штамма были устойчивы к пенициллину, ампициллину и спектиномицину со значением МИК 256 мкг/мл. У штамма *Bacillus* sp. LR2HG21 максимальная резистентность обнаружена к ампициллину со значением МИК 2048 мкг/мл. Значение МИК для цефуроксима и меропенема составляло 1024 мкг/мл, а для пенициллина, спектиномицина и цефалоспоринового антибиотика цефтазида — по 512 мкг/мл (табл. 1).

Следует отметить, что в данной работе определение МИК выполняли с использованием методов последовательных разведений в микропланшете, а большинство экспериментов по определению значения МИК в отношении бактерий рода *Bacillus* выполнены методом градиентной диффузии, поэтому прямое сравнение полученных результатов с литературными данными было бы некорректно, хотя в ряде работ была отмечена устойчивость штаммов рода *Bacillus* к пенициллину и некоторым другим антибиотикам [2].

Определение наличия эффлюкса. Основным параметром, определяющим эффективность антимикробных препаратов по отношению к штамму микроорганизма, является величина МИК антибиотика, которая может определяться, в том числе, и наличием у клеток активных насосов, откачивающих антибиотик из клетки и функционирующих за счет электрохимического потенциала мембраны [12]. Вклад системы эффлюкса в устойчивость исследуемых нами штаммов была оценена путем измерения значения МИК для

антибиотиков до и после воздействия ингибитора эффлюксного насоса СССР. Было показано, что внесение СССР в питательную среду без антибиотиков не приводило к подавлению роста культур. Добавление СССР к засеянной в питательную среду культуре в присутствии антибиотика приводит к беспрепятственному накоплению этого антибиотика в клетке и, следовательно, к снижению МИК у бактерий, которые обладают активными откачивающими насосами.

Все изучаемые нами штаммы бактерий показали высокую устойчивость к действию пенициллина и ампициллина (табл. 1). Наличие эффлюкс-насосов, активных в отношении этих антибиотиков, исследовали у *B. licheniformis* 7-12, *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, *B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21 и *Bacillus* sp. НЕР3В2 (табл. 2). Установлено, что у *B. licheniformis* 7-12 и *B. licheniformis* КМ-МГУ 14 в присутствии пенициллина или ампициллина механизм эффлюкса отсутствует. Это свидетельствует о том, что у этих штаммов устойчивость к исследованным антибиотикам обусловлена, видимо, только активностью β -лактамазы, разрушающей антибиотик. В то же время у штаммов *B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21 и *Bacillus* sp. НЕР3В2 в присутствии пенициллина или ампициллина отмечена очень высокая активность эффлюкса (табл. 2).

Кроме пенициллина и ампициллина для изучения эффлюкса у *B. licheniformis* 7-12 были отобраны цефтазидим как цефалоспориновый антибиотик III-го поколения, к которому уровень устойчивости бактерий еще относительно низкий (значение МИК 128 мкг/мл), а механизм этой устойчивости видимо только начал формировать-

Таблица 2

Значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков и активность эффлюкс-насосов у штаммов бактерий рода *Bacillus* для пенициллина, ампициллина, некоторых цефалоспоринов и спектиномицина

Микроорганизм	Антибиотик	МИК антибиотика (мкг/мл)	МИК в присутствии СССР (мкг/мл)	Кратность уменьшения МИК	Активность эффлюкса
<i>B. licheniformis</i> 7-12	Пенициллин	1024	1024	1	Отсутствует
<i>B. licheniformis</i> 7-12	Ампициллин	1024	1024	1	Отсутствует
<i>B. licheniformis</i> КМ-МГУ 14	Пенициллин	128	128	1	Отсутствует
<i>B. licheniformis</i> КМ-МГУ 14	Ампициллин	256	256	1	Отсутствует
<i>B. subtilis</i> 14-12	Пенициллин	2048	16	128	Высокая
<i>B. subtilis</i> 14-12	Ампициллин	2048	16	128	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. R2HG21	Пенициллин	2048	2	1024	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. R2HG21	Ампициллин	2048	2	1024	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	Пенициллин	1024	2	512	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	Ампициллин	512	16	32	Высокая
<i>B. licheniformis</i> 7-12	Цефтазидим	128	16	8	Умеренная
<i>B. licheniformis</i> 7-12	Спектиномицин	512	32	16	Умеренная
<i>B. pumilus</i> 8-12	Цефтриаксон	128	6	8	Умеренная
<i>B. pumilus</i> 8-12	Цефепим	1024	64	16	Умеренная
<i>Bacillus</i> sp. LR2HG21	Цефепим	64	16	4	Умеренная
<i>Bacillus</i> sp. LR2HG21	Спектиномицин	512	32	16	Умеренная
<i>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	Цефепим	128	2	64	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. НЕР3В2	Спектиномицин	256	2	128	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. PWN2D	Спектиномицин	256	8	32	Высокая
<i>Bacillus</i> sp. DLA64	Спектиномицин	256	2	128	Высокая

ся, и спектиномицин как антибиотик, заведомо не подверженный действию β -лактамазы и к которому *B. licheniformis* 7-12 проявил высокую устойчивость с МИК 512 мкг/мл. В присутствии цефтазида или спектомицина у *B. licheniformis* 7-12 проявлялась умеренная активность эффлюкса.

Для определения наличия эффлюкс-насосов у *B. pumilus* 8-12 были отобраны цефалоспорины III-го и IV-го поколений цефтриаксон и цефепим со значениями МИК 128 и 1024 мкг/мл соответственно (табл. 2). Значения МИК этих антибиотиков в присутствии СССР указывают на умеренную активность эффлюкс-насосов (табл. 2).

Наличие эффлюкс-насосов у штаммов *Bacillus* sp. LR2HG21 и *Bacillus* sp. НЕР3В2 изучали с применением цефепима и спектиномицина, а у штаммов PWN2D и DLA64 только с использованием спектиномицина. Цефепим был взят как цефалоспорин IV-го поколения, представляющий наибольший интерес ввиду его новизны, а спектиномицин использовался как антибиотик, заведомо не разрушающийся β -лактамазой. У *Bacillus* sp. LR2HG21 выявлена умеренная, а у *Bacillus* sp. НЕР3В2 высокая активность эффлюкс-насосов в отношении как цефепима, так и спектиномицина (табл. 2). У двух штаммов бацилл — PWN2D и DLA64 — была обнаружена высокая активность эффлюксных насосов в отношении спектиномицина (табл. 2).

В результате многолетнего изучения микробиома МКС было установлено, что среди бактерий доминировали по частоте обнаружения виды рода *Staphylococcus*, а на втором месте были бактерии рода *Bacillus* [3, 13]. И если преобладание стафилококков можно объяснить их связью с человеком [4, 5], то высокая встречаемость представителей рода *Bacillus* связана с их чрезвычайно высокой устойчивостью к высушиванию и недостатку питательных веществ [14]. Бактерии рода *Bacillus* встречаются повсеместно, число их видов уже превышает 200. Однако на МКС видовое разнообразие изученных бацилл составляет не более двух десятков видов, и доминируют *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*. [2, 3, 13]. Исторически *B. anthracis* был признан единственным патогенным видом рода, однако некоторые штаммы *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. alvei* были описаны как оппортунистические и даже патогенные [8].

Штаммы *B. licheniformis* 7-12 и *B. pumilus* 8-12 продемонстрировали намного более высокую устойчивость к пенициллину и ампициллину, чем штаммы *B. licheniformis* КМ-МГУ 14 и *B. pumilus* КМ-МГУ 364, взятые для сравнительного анализа из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Многие штаммы бацилл, выделенных с РС МКС, проявили высокую устойчивость к цефалоспорином I-IV поколений и меропенему (табл. 1). В то же время все штаммы, взятые из коллекции

МГУ — *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, *B. pumilus* КМ-МГУ 364, *B. subtilis* КМ-МГУ 25, а также некоторые «космические» штаммы бацилл — *Bacillus* sp. PWN2D и *Bacillus* sp. DLA64 — показали очень низкую устойчивость к цефалоспорином поколений I-IV и меропенему (табл. 1). И если низкую устойчивость коллекционных культур можно объяснить их многолетним хранением в коллекции, в результате чего устойчивость к антибиотикам у них не успела сформироваться, то причины и механизмы резистентности к антибиотикам у «космических» штаммов могут быть различными.

Первой предполагаемой причиной появления в космосе штаммов бацилл, устойчивых к ряду антибиотиков, могут быть, прежде всего, мутации, вызванные предполетной стерилизацией оборудования и приборов с помощью УФ-облучения, перекиси водорода или других дезинфектантов, а также мутации, обусловленные воздействием специфических условий космоса — космическим излучением и микрогравитацией. Не исключено попадание на МКС устойчивых штаммов бацилл и с космонавтами, поскольку эти бактерии являются частью микробиоты человеческой кожи и кишечника [15]. В любом случае клинически значимая устойчивость к противомикробным препаратам появившихся на МКС штаммов может распространяться путем горизонтального переноса генов — например, с помощью плазмид [13, 16]. Так, у большинства из 40 штаммов бацилл, выделенных из проб исследовательской станции в Антарктике и МКС, обнаружили одну или две плазмиды, некоторые из которых были связаны с репликационными элементами вирулентности *B. anthracis* rXO1 и rXO2. Кроме того, было установлено, что шесть из 25 протестированных штаммов приобрели чужеродную ДНК путем конъюгации [13, 16]. Как уже говорилось, доминирующим родом бактерий на МКС является *Staphylococcus*. Известно также, что стафилококки оказались первыми микроорганизмами, среди которых широкое распространение получила устойчивость к β -лактамам антибиотикам, что привело к существенному снижению эффективности традиционной терапии [17]. Вероятно, исследуемые нами бациллы могли приобрести β -лактамазную устойчивость от стафилококков, что привело к повышению их устойчивости к антибиотикам.

И наконец, исследованные нами штаммы бацилл могли приобрести один из механизмов защиты от антибиотиков, среди которых — модификация мишени действия антибиотика, его инактивация, активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс), нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки. Все эти механизмы способны функционировать как по отдельности, так и в комплексе. Мы исследовали возможность функционирования у наших штаммов эффлюкса. Этот механизм возник в ходе

эволюции для защиты от веществ, ингибирующих метаболизм микроорганизма.

Полученные данные указывают на отсутствие у *B. licheniformis* 7-12 и *B. licheniformis* КМ-МГУ 14, показывающих высокие значения МИК к пенициллину и ампициллину, активных эффлюкс-систем (табл. 2). Высокая устойчивость к данным антибиотикам у этих штаммов, по-видимому, связана с инактивацией их β -лактамазами. В то же время у выделенных из проб МКС штаммов *B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21 и *Bacillus* sp. НЕР3В2 в присутствии пенициллина или ампициллина отмечена очень высокая активность эффлюкса. Следовательно, механизм устойчивости к пенициллину или ампициллину у разных штаммов бацилл может различаться.

В присутствии цефтазидима, цефтриаксона, цефепима и спектиномицина у *B. licheniformis* 7-12, *B. pumilus* 8-12 и *Bacillus* sp. LR2HG21 обнаружена умеренная активность эффлюкс-насосов (табл. 2), что позволяет предположить присутствие у этих штаммов дополнительных к эффлюкс-системам механизмов устойчивости — например, β -лактамазной активности. Установленная нами высокая активность эффлюксных насосов у штамма НЕР3В2 по отношению к цефепиму и спектиномицину, а у штаммов PWN2D и DLA64 — к спектиномицину позволяет считать, что у этих штаммов основным механизмом устойчивости к исследованным антибиотикам является эффлюкс (табл. 2).

Эффлюкс-насосы встречаются практически у всех видов бактерий, гены, кодирующие этот класс белков, могут быть расположены на хромосомах или плазидах и передаваться путем горизонтального переноса [18, 19]. Эффлюксные насосы можно разделить на две группы: первичные и второстепенные транспортеры. Семейство транспортеров ABC относится к первой группе. Для функционирования эти транспортеры используют энергию гидролиза АТФ. Второстепенные транспортеры включают семейства MFS, SMR, RND, MATE и функционируют за счет электрохимического потенциала мембраны

[17, 20]. Одним из самых распространенных способов подавления эффлюкс-насосов, относящихся к второстепенным транспортерам, является применение СССР. Этот разобщитель процесса окислительного фосфорилирования нарушает протонный градиент мембран, необходимый для активности эффлюкс-насосов [12, 21, 22].

Активность эффлюкс-насосов может меняться за счет возникновения различных мутаций, которые в некоторых случаях приводят к повышению эффективности выброса антибиотика из клетки [22]. Для грамположительных бактерий клинически значимыми эффлюксными насосами, определяющими устойчивость к широкому спектру антибиотиков, являются транспортеры, входящие в семейство MFS [18]. Лучше всего структура эффлюкс-насосов среди грамположительных бактерий изучена у *B. subtilis*. У них обнаружены транспортеры, относящиеся к семействам MFS и SMR [18, 21, 23, 24]. Основываясь на данных литературы и действию СССР в отношении исследуемых штаммов (табл. 2), можно полагать, что обнаруженные нами системы активного оттока антибиотиков у штаммов бацилл относятся к группе второстепенных транспортеров семейств MFS или SMR, описанных для рода *Bacillus* [12, 18, 21, 23, 24].

До сих пор не сообщалось о серьезных инфекциях или вспышках болезней на МКС [25]. Однако обнаруженные штаммы бактерий, обладающие высокой устойчивостью в отношении некоторых антибиотиков, требуют дальнейшего скрининга микробиоты МКС для своевременного предупреждения возможных потенциальных рисков, которые могут представлять некоторые из этих микроорганизмов для здоровья людей с ослабленным иммунитетом — например, космонавтов — в результате их работы в экстремальных условиях длительного космического полета.

Работа финансировалась за счет собственных средств авторов. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mora M., Mahnert A., Koskinen K., Pausan M.R., Oberauer-Wappis L., Krause R., Perras A.K., Gorkiewicz G., Berg G., Moissl-Eichinger C. Microorganisms in confined habitats: microbial monitoring and control of intensive care units, operating rooms, cleanrooms and the International Space Station // Front Microbiol. 2016. Vol. 7: 1573.
2. Mora M., Perras A., Alekhova T., Wink L., Krause R., Aleksandrova A., Novozhilova T., Moissl-Eichinger C. Resilient microorganisms in dust samples of the International Space Station-survival of the adaptation specialists // Microbiome. 2016. Vol. 4. N 1. P. 65–85.
3. Alekhova T.A., Zakharchuk L.M., Tatarinova N.Y., Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G.

- Diversity of bacteria of the genus *Bacillus* on board of international space station // Dokl. Biochem. Biophys. 2015. Vol. 465. N 1. P. 104–107.
4. Coil D.A., Neches R.Y., Lang J.M., Brown W.E., Severance M., Cavalier D.D., Eisen J.A. Growth of 48 built environment bacterial isolates on board the International Space Station (ISS) // Peer J. 2016. Vol. 4: e1842.
5. Moissl-Eichinger C., Cockell C., Rettberg P. Venturing into new realms? Microorganisms in space // FEMS Microbiol. Rev. 2016. Vol. 40. N 5. P. 722–737.
6. Checinska A., Probst A.J., Vaishampayan P., White J.R., Kumar D., Stepanov V.G., Fox G.E., Nilsson H.R., Pierson D.L., Perry J., Venkateswaran K.

Microbiomes of the dust particles collected from the International Space Station and Spacecraft Assembly Facilities // *Microbiome*. 2015. Vol. 3. N 1. P. 50–68.

7. Vaishampayan K.P., Cisneros J., Pierson D.L., Rogers S.O., Perry J. International Space Station environmental microbiome-microbial inventories of ISS filter debris // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98. N 14. P. 6453–6466.

8. Farrar W.E., Rebolli A.C. The genus *Bacillus*—Medical // *The Prokaryotes. Handbook on the biology of bacteria*, vol. 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. N.Y.: Springer-Verlag, 2006. P. 609–630.

9. Janda J.M., Abbot S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // *J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45. N 9. P. 2761–2764.

10. Elshikh M., Ahmed S., Funston S., Dunlop P., McGaw M., Marchant R., Banat I.M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants // *Biotechnol. Lett.* 2016. Vol. 38. N 6. P. 1015–1019.

11. Ardebili A., Lari A.R., Talebi M. Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates // *Ann. Lab. Med.* 2014. Vol. 34. N 6. P. 433–438.

12. Li X.Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria // *Drugs*. 2004. Vol. 64. N 2. P. 159–204.

13. Timmerly S., Hu X., Mahillon J. Characterization of *Bacilli* isolated from the confined environments of the Antarctic Concordia station and the International Space Station // *Astrobiology*. 2011. Vol. 11. N 4. P. 323–334.

14. Horneck G., Moeller R., Cadet J., Douki T., Rocco L., Mancinelli R.L., Wayne L., Nicholson W.L., Panitz C., Rabbow E., Rettberg P., Spry A., Stackebrandt E., Vaishampayan P., Venkateswaran K.J. Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes – Experiment PROTECT of the EXPOSE-E Mission // *Astrobiology*. 2012. Vol. 12. N 5. P. 445–456.

15. Gaci N., Borrel G., Tottey W., O'Toole P.W., Brugère J-F. Archaea and the human gut: new beginning of an old story // *World J. Gastroenterol.* 2014. Vol. 20. N 43. P. 16062–16078.

16. Nolivos S., Cayron J., Dedieu A., Page A., Delolme F., Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer // *Science*. 2019. Vol. 364. N 6442. P. 778–782.

17. Foster T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. Vol. 41. N 3. P. 430–449.

18. Piddock L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. Vol. 4. N 8. P. 629–636.

19. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms // *Ann. Med.* 2007. Vol. 39. N 3. P. 162–176.

20. Blair J.M.A., Richmond G.E., Piddock L.J.V. Multidrug efflux pumps in gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance // *Future Microbiol.* 2014. Vol. 9. N 10. P. 1165–1177.

21. Peleg A.Y., Adams J., Paterson D.L. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. Vol. 51. N 6. P. 2065–2069.

22. Baranova N., Elkins C.A. Antimicrobial drug efflux pumps in other gram-positive bacteria // *Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria. Mechanisms, regulation and clinical implications* / Eds. X. Li, C.A. Elkins, and H.I. Zgurskaya. Cham: Springer, 2018. P. 197–218.

23. Maseoka Y., Ueno Y., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T. A two-component multidrug efflux pump, EbrAB, in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2000. Vol. 182. N 8. P. 2307–2310.

24. Zhang Z.C., Pornillos M.O., Chang X.G., Saier M.H. Functional characterization of the heterooligomeric EbrAB multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46. N 17. P. 5218–5225.

25. Van Houdt R., Mijnenonckx K., Leys N. Microbial contamination monitoring and control during human space missions // *Planet Space Sci.* 2012. Vol. 60. N 1. P. 115–120.

Поступила в редакцию 08.09.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята в печать 15.10.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics of strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from samples delivered from the International Space Station

R.R. Yenikeev* , N.Y. Tatarinova , L.M. Zakharchuk 

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

*e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com

The Russian segment of the International Space Station, as a closed habitat, is a favorable environment for the development of microorganisms. There are bacteria and fungi of various systematic groups, some of which can lead to infections. Thus, certain species of spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* are dangerous. In seven strains of bacteria of this genus,

isolated from samples obtained at the station, resistance to such β -lactam antibiotics as penicillin, ampicillin, meropenem, a number of cephalosporin derivatives I (cefazolin), II (cefuroxime), III (ceftriaxone, cefoperazone, ceftazidime), IV (cefepime) generations, as well as the aminocyclitol antibiotic spectinomycin. It was found that all these strains are resistant to penicillin and ampicillin with a minimum inhibitory concentration (MIC) from 16 to 2048 $\mu\text{g/ml}$, as well as to cephalosporin antibiotics and meropenem with a MIC value from 2 to 2048 $\mu\text{g/ml}$. Bacterial resistance to spectinomycin used in patients with allergy to β -lactams penicillins and cephalosporins is in the MIC range from 32 to 2048 $\mu\text{g/ml}$. The absence of active efflux pumps in *B. licheniformis* 7-12 with high MIC values for penicillin and ampicillin suggested that this strain has a β -lactamase defense mechanism against these antibiotics. In three more strains resistant to penicillin and ampicillin – *B. subtilis* 14-12, *Bacillus* sp. R2HG21, *Bacillus* sp. HEP3B2 functions another defense mechanism – active transport of the antibiotic from the cell, mediated by the presence of efflux pumps, functioning due to the electrochemical potential of the cell membrane. It has been shown that, in six strains of the studied bacilli, resistance to cephalosporin derivatives of the 3rd-4th generations of ceftriaxone, ceftazidime, cefepime and the aminocyclitol antibiotic spectinomycin is also apparently provided by systems of active outflow of xenobiotics belonging to the group of secondary transporters.

Keywords: *Russian Segment of the International Space Station (ISS RS), bacteria of the genus Bacillus, antibiotic resistance, minimum inhibitory concentration, efflux pumps, closed habitat*

Сведения об авторах

Еникеев Радмир Рустамович – аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8467-9051>

Татаринова Наталья Юрьевна – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: nata.tatarinova53@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9883-5780>

Захарчук Леонид Михайлович – докт. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: zakharchuk@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3783-3279>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.64+574.632

**Токсичность иона алюминия для *Daphnia magna* Straus
в зависимости от жесткости природной и искусственной воды****О.В. Воробьева^{1,2,*} , Е.Ф. Исакова¹ , М.А. Заец¹ ,
А.Ю. Мерзеликин¹ , Т.А. Самойлова² **¹Кафедра общей экологии и гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Россия, 107140, Россия, Москва, ул. Верхняя Красносельская, д. 17

*olvorobieva@rambler.ru

Токсичность химических веществ зависит не только от их концентрации, но и от гидрохимического состава воды (концентрации кальция и магния, гуминовых веществ и т.д.), который важно учитывать при экстраполяции результатов биотестирования в природные условия. Было проведено исследование острой токсичности хлорида алюминия на односуточных ракообразных *Daphnia magna* с использованием природной и искусственной воды, характеризующейся разными параметрами жесткости. Как на искусственной, так и на природной воде показано снижение токсичности ионов алюминия с увеличением жесткости, однако диапазон изменения токсичности в искусственной воде оказался значительно меньше, чем в природной воде. Так, в искусственной воде увеличение жесткости с 0,06 до 1,84°Ж привело к увеличению значения полулетальной концентрации алюминия за 48 ч в 1,57 раза, тогда как на природной воде схожий диапазон изменения жесткости (0,06–2,43°Ж) привел к изменению данного показателя почти в 6 раз. Подобные различия могут быть связаны с влиянием других гидрохимических факторов, характерных для исследованных типов воды. Таким образом, при проведении биотестирования с целью экологического нормирования искусственная вода не может служить полноценной заменой природной воды, химический состав которой характеризуется территориальной неоднородностью.

Ключевые слова: *Daphnia magna*, алюминий, биотестирование, токсичность, жесткость, чувствительность тест-организмов

В настоящее время накоплен достаточный массив данных, свидетельствующий о том, что токсичность химических веществ зависит не только от их концентрации, но и от содержания в воде других веществ (например, кальция или гумусовых кислот), pH, температуры, комбинаций с другими веществами [1–3]. Важную роль играет территориальная природная неоднородность химического состава поверхностных вод, которая обусловлена различными факторами — составом горных пород, почв, атмосферными осадками, климатом, рельефом, гидрогеологическими и гидродинамическими условиями, составом растительного покрова, живыми организмами и особенно наличием залежей полезных ископаемых [4, 5]. Таким образом, в каждом водном объекте формируется состав воды, определяющийся данной водосборной территорией и зависящий от природно-климатических условий, что, в конечном итоге, оказывает влияние на проявление токсичности попадающих в него веществ. Особенности гидрохимического состава вод конкретного региона необходимо учи-

тывать при проведении биотестирования с целью экологического нормирования.

Одним из основных факторов, влияющих на токсичность загрязняющих веществ для гидробионтов, является жесткость [3, 6]. В природной воде значения жесткости колеблются в широких пределах, изменяясь по временам года. Известно снижение с повышением жесткости воды летального действия высоких концентраций алюминия, меди, кадмия — на рыб, хрома, кадмия, цинка и меди — на беспозвоночных [7–9]. Так, например, значение полулетальных концентраций меди и цинка для рыб *Carpoeta fusca* увеличивалось в 5 раз при увеличении содержания ионов кальция с 40 до 150 мг Ca²⁺/л [10]. Уменьшение жесткости воды с 5,10 до 0,60 и 0,38°Ж приводило к усилению токсичности растворов токсикантов для ракообразных *Ceriodaphnia affinis* [11].

Изменение токсичности загрязняющих веществ и их смесей при снижении жесткости воды может определяться как химическим механизмом (комплексобразованием и снижением концент-

рации токсичных веществ), так и биологическими факторами (биодоступностью, бионакоплением, ролью кальция в регуляции процессов проницаемости клеточных мембран). Известно, что высокое содержание кальция в воде снижает скорость поступления и препятствует аккумуляции катионов в тканях гидробионтов. На различных группах гидробионтов показано, что в жесткой воде тип взаимодействия веществ в смесях обычно определяется как аддитивный, а в мягкой воде — синергический. При этом жесткость влияет не только на проявление токсического эффекта веществ, но и на жизнедеятельность гидробионтов — например, при низких значениях жесткости ($0,38^{\circ}\text{Ж}$) наблюдается снижение плодовитости *C. affinis* по сравнению с плодовитостью при диапазоне жесткости $0,60\text{--}5,10^{\circ}\text{Ж}$ [11]. Таким образом, исследование зависимости проявления токсичности веществ от жесткости воды является важной задачей для токсикологических исследований.

В качестве модельного токсиканта был выбран алюминий, являющийся самым распространенным металлом в земной коре и широко используемый как в промышленности, так и в качестве коагулянта при очистке сточных вод. Шламы от производства металла взаимодействуют с технической водой, используемой для удаления отходов, и попадают в водную среду, воздействуя, таким образом, на гидробионтов. Ионы алюминия способны образовывать комплексы с гуминовыми веществами, имеют сродство к кислороду, являясь, таким образом, центром осадкообразования. Алюминий может связываться с компонентами клеточной мембраны, выступая в качестве заместителя кальция в межмембранном пространстве и нарушая тем самым проницаемость мембраны, что, в свою очередь, влияет на ионный обмен. Кроме того, алюминий может образовывать прочные комплексы с АТФ, воздействуя на большинство ферментативных реакций и нарушая метаболизм [12].

Токсический эффект алюминия может зависеть от содержания ионов кальция в среде. Кальций, который формирует жесткость воды, определяет также положительный заряд на мембранах живых организмов. При его высокой концентрации происходит отталкивание положительно заряженных ионов металлов, что замедляет их проникновение в клетку [13]. Ранее [14] в острых опытах изучалось влияние ионов алюминия на дафний при разных значениях pH ($6,5\text{--}5,5\text{--}4,5$) и разной концентрации ионов кальция ($12,5$ и $2,5$ мг Ca^{2+} /л). Максимальная токсичность была выявлена при pH $6,5$ и концентрации ионов кальция $2,5$ мг Ca^{2+} /л.

Таким образом, выявление особенностей зависимости проявления токсического действия металла от жесткости воды является важной задачей и может найти широкое применение в усовершенствовании методологии биотестирования.

Материалы и методы

Источниками природной воды служила вода двух озер, Большого и Малого Вудъявра, расположенных на Кольском полуострове, а также вода из московского водопровода (аквариумная вода). Кроме того, были проведены опыты на искусственной воде, приготовленной на основе рецептов, применяемых при оценке качества водной среды.

Озеро Большой Вудъявр располагается в местности, подверженной антропогенному влиянию промышленных предприятий и городских стоков. В основном, озеро Большой Вудъявр относят к эвтрофному типу озер, за исключением нескольких мезотрофных участков. Исследования показали, что поступление шахтных вод ведет к низкому таксономическому разнообразию, однако показатели численности и биомассы гидробионтов остаются высокими. Малый Вудъявр — озеро, существенно не загрязненное антропогенными источниками, подвержено воздействию дождевых стоков и воздушных переносов. Аквариумная вода взята из московского водопровода и прошла процесс фильтрации, аэрации, отстаивания в течение 2 нед., а также содержание в аквариуме с грунтом и высшей водной растительностью, где происходило насыщение метаболитами.

В качестве искусственной воды была использована модифицированная среда ADaM — наиболее известная среда для культивирования зоопланктона, где в качестве набора микроэлементов использовали синтетическую морскую соль [15]. В связи с тем, что в среде ADaM превышено значение рыбохозяйственного норматива предельно допустимой концентрации (ПДК) селена (в среде ADaM — $0,05$ мг Se/л, при ПДК — $0,002$ мг Se/л), была разработана искусственная среда ИСП-2 с базовым ионным составом на 1 л воды: Ca^{2+} — 133 мг, K^{+} — 36 мг, Na^{+} — 258 мг, Mg^{2+} — 11 мг, SeO_2 — $0,021$ мг, Cl^{-} — 275 мг, HCO_3^{-} — 415 мг, Br^{-} — $5,46$ мг, F^{-} — $0,086$ мг, BO_3^{3-} — $2,2$ мг, SO_4^{2-} — 44 мг. Значение pH среды составляет $7,76$. При моделировании жесткости CaCl_2 и MgSO_4 добавляли в нужных пропорциях.

Перед исследованиями были проведены анализы всех вариантов воды методами масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП).

В качестве тест-объекта использовали дафний (*Daphnia magna* Straus), являющихся чувствительным тест-объектом для оценки влияния факторов физической и химической природы и широко используемых в биотестировании и водной токсикологии для оценки антропогенных воздействий [16–20]. Маточные культуры рачков для экспериментов культивировали на трех средах: аквариумной воде, воде из озера Малый Вудъявр и искусственной воде; для опытов на воде из озера Большой Вудъявр использовали рачков, культиви-

руемых на воде из озера Малый Вудъявр. В качестве токсиканта использовали кристаллогидрат хлорида алюминия ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Предварительно проводили эксперименты для определения влияния хлорида алюминия в разных концентрациях на кислотность аквариумной воды и воды из озера Малый Вудъявр. Опыты сопровождались контрольными испытаниями без добавления токсического вещества. Измерения проводили с помощью рН-метра Starter 2100 Bench (ОНАУС, США) ежедневно, один раз в сутки, в течение четырех дней.

Оценку токсического действия хлорида алюминия на дафний проводили по стандартной методике, разработанной на кафедре гидробиологии МГУ [21]. 48-часовые эксперименты на дафниях проводили на всех типах воды в трехкратной повторности по 10 экземпляров односуточных рачков на 100 мл раствора в каждой. Таким образом, общий объем выборки для каждой линии составил 30 особей, всего в экспериментах была проанализирована выживаемость 1500 рачков. Растворы на искусственной воде готовили с суммарным содержанием ионов кальция и магния 100, 70, 50, 30, 20, 10, 1 мг/л (при молярном соотношении $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} = 1,13$). Эти значения были переведены из мг/л в °Ж, где 1 °Ж соответствует 20,04 мг/л Ca^{2+} или 12,15 мг/л Mg^{2+} .

Степень острой токсичности вещества оценивали на основании величины ЛК_{50} , вычисленной по результатам острого опыта. Для расчета величины ЛК_{50} применяли логнормальную регрессионную модель с двумя параметрами (верхняя и нижняя асимптоты равны 1 и 0 соответственно):

$$f(x) = \Phi\{b(\log(x) - \log(e))\},$$

где Φ — кумулятивная функция плотности для стандартного нормального распределения, e — определяет положение точки перегиба сигмоидной кривой и соответствует ЛК_{50} , b — коэффициент угла наклона в области точки перегиба. Вычисления выполняли в статистической среде R с помощью пакета drc (version: 3.0-1), предназначенного для анализа зависимостей доза-эффект [22]. 95%-й доверительный интервал для ЛК_{50} вычисляли на основе дельта-метода, реализованного в данном ПО.

Результаты и обсуждение

В ходе предварительного 96-часового опыта по исследованию динамики рН растворов было показано, что вода из озера Малый Вудъявр имела более низкие значения рН, чем аквариумная вода (7,7 и 8,1 соответственно). Добавление хлорида алюминия привело к подкислению растворов, с максимальным изменением значения рН при концентрации 100 мг Al/л.

В воде из озера Малый Вудъявр с концентрацией алюминия 100 мг/л в первый час после при-

готовления растворов рН понизился на три единицы по сравнению с контролем и сохранялся на этом уровне до конца эксперимента (96 ч). В аквариумной воде разница водородного показателя между контролем и раствором с концентрацией 100 мг Al/л составила 1,72 ед. в первый час эксперимента и уменьшилась спустя 96 ч до 0,62 ед.

Концентрация 1 мг Al/л не оказала влияние на кислотность растворов, при концентрациях 5 и 10 мг Al/л наблюдалось обратимое снижение рН. Таким образом, в диапазоне концентраций алюминия, использованных в ходе дальнейших исследований (0,5–16 мг/л), не происходило существенного изменения уровня рН.

В табл. 1 приведены результаты острых опытов и гидрохимические показатели исследуемых типов воды (величины жесткости воды даны в пересчете на °Ж). Аквариумная вода является наиболее жесткой из всех исследованных вод, тогда как самой мягкой была вода из озера Малый Вудъявр. Стоит отметить, что каждый тип воды содержит собственное количество алюминия, которое позже учитывалось при интерпретации результатов опытов. Наибольшая концентрация алюминия наблюдалась в воде из озера Большой Вудъявр, куда попадают сточные воды промышленных предприятий.

Таблица 1

Величины ЛК_{50}^{48} алюминия и гидрохимические характеристики исследуемых вод

Источник и дата взятия проб воды		рН	Жесткость, °Ж	Содержание Al, мг/л	ЛК_{50}^{48} мг Al/л
Аквариумная вода		8,1	2,43	0,03	13,66 (12,70–14,61)
Озеро Большой Вудъявр	окт. 2017	8,1	0,54	0,1	5,61 (0,86–10,36)
	авг. 2018	8,1	0,36	0,27	9,67 (7,79–11,55)
Озеро Малый Вудъявр	окт. 2017	7,7	0,06	0,05	1,09 (0,94–1,24)
	авг. 2018	7,7	0,09	0,08	3,36 (2,65–4,08)

Примечание: в скобках указан 95%-й доверительный интервал.

В ходе острых опытов минимальные полулетальные концентрации алюминия за 48 ч (ЛК_{50}^{48}) были получены на воде из озера Малый Вудъявр. Они зависели от срока отбора проб. Это может быть связано с повышением концентрации кальция и магния во время межени в августе 2018 г., и, как следствие, являться причиной понижения острой токсичности алюминия. Интересно отметить, что повышение фонового уровня алюминия не привело к повышению токсичности.

Аквариумная вода имела наибольшие параметры жесткости (2,43 °Ж), на ней была показана наименьшая токсичность алюминия — значение полулетальной концентрации было максималь-

ным и составило 13,66 мг Al/л. Токсичность алюминия в воде из озера Большой Вудъявр имеет промежуточное значение (LK_{50}^{48} составляла 5,61–9,67 мг Al/л). При одинаковой кислотности аквариумной воды и воды из озера Большой Вудъявр (октябрь 2017 г.) первая отличалась большей жесткостью. Таким образом, разница в величинах полулетальных концентраций, полученных на вариантах воды с одинаковой кислотностью и разной жесткостью, может объясняться влиянием жесткости на проявление токсичности металла.

При сравнении результатов опытов на воде из озера Большой Вудъявр вызывает интерес низкая токсичность алюминия в августе 2018 г. (когда вода была более мягкая, а фоновый уровень алюминия более высокий) по сравнению этим показателем для октября 2017 г. Это, вероятно, связано с влиянием на токсичность металлов не только ионов, формирующих жесткость воды, но и органических комплексообразователей, связываясь с которыми, металлы могут переходить в нетоксичную для гидробионтов форму. Так, например, известно, что гуминовые кислоты могут активно адсорбировать тяжелые металлы на своей поверхности, тем самым уменьшая действующую концентрацию в растворе – для дафний показано снижение токсичности металлов (меди, цинка и ртути) [2] в растворах с гуминовыми кислотами.

Таким образом, в ходе исследований было выявлено снижение токсичности алюминия в ряду Малый Вудъявр (2017 > 2018) > Большой Вудъявр (2017 > 2018) > аквариумная вода, что соответствует параметрам жесткости исследуемых вод 0,06, 0,09, 0,54, 0,36 и 2,43 °Ж соответственно. Наибольший токсический эффект алюминия наблюдался в мягкой воде из озера Малый Вудъявра, а наименьший – в аквариумной воде с повышенной жесткостью.

С целью исследования влияния на токсичность алюминия жесткости воды отдельно от других гидрохимических факторов определяли LK_{50}^{48} алюминия в искусственной воде с различной жесткостью. Результаты представлены в табл. 2. При моделировании жесткости искусственной воды в диапазоне от 0,06 до 6,12 °Ж токсичность алюминия несколько снижается при повышении жесткости воды, однако величина снижения токсичности

намного меньше, чем в природной воде, где величины LK_{50}^{48} при жесткости 0,06 и 2,43 °Ж различались на порядок.

Оценка связи токсичности алюминия (величины LK_{50}^{48}) с жесткостью воды с помощью коэффициента корреляции Спирмена показала, что коэффициент корреляции равен 0,69 и эта связь статистически значимая (соответствующее r -значение равно 0,013). Коэффициенты корреляции, вычисленные отдельно для искусственной и природной воды, равны 0,68 и 0,90 соответственно (оба значения статистически незначимы, $r=0,110$ и $r=0,083$), т.е. зависимость токсичности алюминия от жесткости воды, вероятно, в природной воде выражена значительно сильнее, чем в искусственной воде, однако имеющихся данных недостаточно для статистического обоснования данного утверждения.

При низкой жесткости в искусственной воде токсичность алюминия была значительно меньше, чем в природной воде (рисунок). В искусственной воде с жесткостью 0,06 °Ж LK_{50}^{48} составила 6,38 мгAl/л, тогда как в природной воде с той же жесткостью полулетальная концентрация составила 1,09 мгAl/л. Очевидно, на проявление токсичности алюминия влияет не только жесткость, но и другие гидрохимические факторы, характерные для исследованных типов воды.

Различия величин LK_{50}^{48} в разных вариантах природной воды обусловлены, вероятно, состоянием водоемов на момент отбора воды. В августе, во время межени, фоновая концентрации алюминия увеличивалась в связи с испарением воды. Понижение жесткости воды в озере Большой Вудъявр в августе 2018 г. может быть связано с жизнедеятельностью водной флоры и фауны. Аналогичная ситуация наблюдалась в озере Малый Вудъявр – во время межени 2018 г. жесткость была больше, чем при половодье в октябре 2017 г. и, соответственно, токсичность алюминия была ниже. Другими вероятными факторами, влияющими на токсичность алюминия, могут быть присутствующие в воде другие металлы, макро- и микроэлементы, а также органические соединения, в том числе метаболиты живых организмов.

Таким образом, изучение острой токсичности алюминия в природной и искусственной воде с заданными параметрами жесткости пока-

Таблица 2

Токсичность алюминия в искусственной воде с различной жесткостью

Суммарное содержание Ca ²⁺ и Mg ²⁺ , мг/л	1,0	10,0	20,0	30,0	50,0	70,0	100,0
Жесткость, °Ж	0,06	0,61	1,22	1,84	3,06	4,29	6,12
LK_{50}^{48} , мг Al/л	6,38 (3,60–9,16)	7,62 (0–16,92)	8,29 (1,47–15,11)	10,04 (9,05–11,04)	10,0 (9,81–10,18)	8,89 (8,43–9,34)	9,0 (8,52–9,47)

Примечание: в скобках указан 95%-й доверительный интервал.

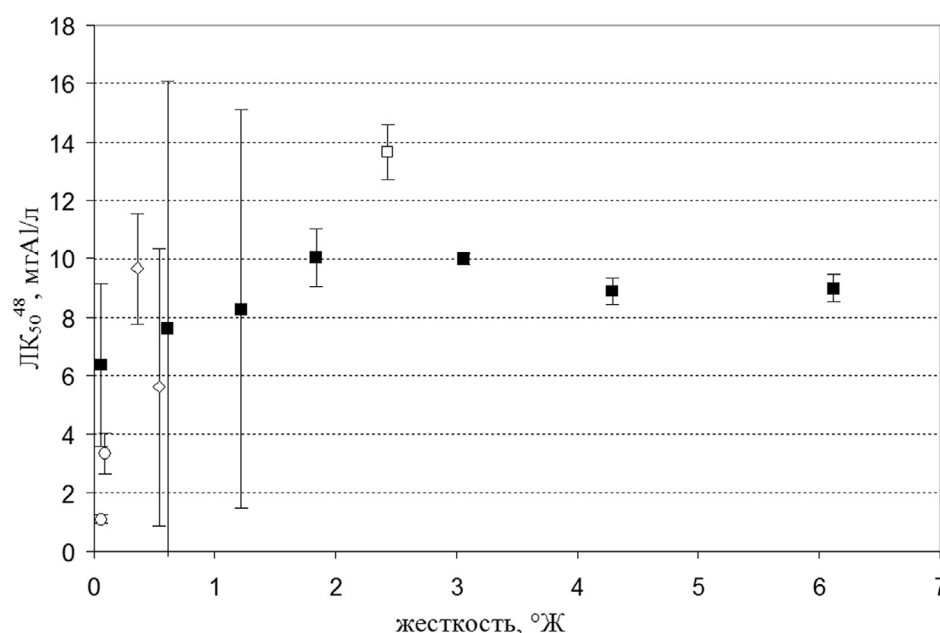


Рисунок. Значения полулетальных концентраций хлорида алюминия (в пересчете на ион алюминия) за 48 ч в воде из разных источников, ранжированных по степени жесткости. Пояснения: ■ — искусственная вода, □ — аквариумная вода, ◇ — вода из озера Большой Вудьявр, ○ — вода из озера Малый Вудьявр («усы» показывают доверительный интервал).

зало снижение токсичности металла при повышении жесткости воды. В искусственной воде диапазон изменения токсичности был значительно меньше, чем в природной воде, что предположительно связано с различными присутствующими в природной воде гидрохимическими факторами, совместно воздействующими на тест-организмы.

Это может свидетельствовать о том, что искусственная вода с заданными параметрами жесткости не может служить полным аналогом природной воды при определении токсичности веществ, так как не позволяет учесть все компоненты, присутствующие в природной воде и влияющие на биодоступность, а в конечном итоге — на токсичность веществ. При решении таких задач, как разработка региональных ПДК, требующих учета природной территориальной неоднородности химического состава поверхностных вод, необходимо проведение экспериментов на при-

родной воде, отражающей гидрохимические характеристики региона.

Вместе с тем, искусственные среды, благодаря полностью контролируемому составу, незаменимы при исследовании изолированного влияния различных факторов, а также их взаимодействия, что в перспективе способствует решению задачи экстраполяции результатов лабораторных исследований на процессы, происходящие в природной воде.

Работа выполнена при финансировании из госбюджета в рамках НИР «Исследование эффекта потенциально токсичных веществ на водные организмы и сообщества с целью защиты водных экосистем» № АААА-А16-116021660047-6. Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heugens E.H., Jager T., Creighton R., Kraak M.H.S., Hendriks A.J., Van Straalen N.M., Admiraal W. Temperature-dependent effects of cadmium on *Daphnia magna*: accumulation versus sensitivity // Environ. Sci. Technol. 2003. Vol. 37. N 10. P. 2145–2151.
2. Oikari A., Kukkonen J., Virtanen V. Acute toxicity of chemicals to *Daphnia magna* in humic waters // Sci. Total Environ. 1992. Vol. 117–118. P. 367–377.
3. Филленко О.Ф., Михеева И.В. Основы водной токсикологии. М.: Колос, 2007. 144 с.
4. Risnik D.V., Belyaev S.D., Bulgakov N.G., Levich A.P., Maksimov V.N., Mamikhin S.V., Mil'ko E.S., Fursova P.V., Rostovtseva E.L. Approaches to standardization of environmental quality: alternatives to the standardization system in use in the Russian Federation // Biol. Bull. Rev. 2013. Vol. 3. N 4. P. 247–260.
5. Viers J., Dupré B., Gaillardet J. Chemical composition of suspended sediments in World Rivers: New insights from a new database // Sci. Total Environ. 2009. Vol. 407. N 2. P. 853–868.
6. Kiyani V., Hosynzadeh M., Ebrahimpour M. Investigation acute toxicity some of heavy metals at different water hardness // Int. J. Adv. Biol. Biom. Res. 2013. Vol. 1. N 2. P. 134–142.

7. Olkova A.S., Kantor G.Y., Kutyavina T.I., Ashikhmina T.Y. The importance of maintenance conditions of *Daphnia magna* Straus as a test organism for ecotoxicological analysis // Environ. Toxicol. Chem. 2018. Vol. 37. N 2. P. 376–384.
8. Santore R.C., Di Toro D.M., Paquin P.R., Allen H.E., Meyer J.S. Biotic ligand model of acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia* // Environ. Toxicol. Chem. 2001. Vol. 20. N 10. P. 2397–2402.
9. Yim J.H., Kim K.W., Kim S.D. Effect of hardness on acute toxicity of metal mixtures using *Daphnia magna*: prediction of acid mine drainage toxicity // J. Hazard. Mater. 2006. Vol. 138. N 1. P. 16–28.
10. Ebrahimpour M., Alipour H., Rakhshah S. Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish // Toxicol. Ind. Health. 2010. Vol. 26. N 6. P. 361–365.
11. Чалова И.В., Флеров Б.А. Влияние жесткости воды на хроническую токсичность смеси загрязняющих веществ для *Ceriodaphnia affinis* Lill. (Crustacea, Cladocera) // Тр. Инст. биол. внутр. вод РАН. 2017. № 77(80). С. 143–148.
12. Ganrot P.O. Biochemistry and metabolism of Al^{3+} and similar ions: a review // Environ. Health Perspect. 1986. Vol. 65. P. 363–369.
13. Hollis L., McGeer J.C., McDonald D.G., Wood C.M. Protective effects of calcium against chronic waterborne cadmium exposure to juvenile rainbow trout // Environ. Toxicol. Chem. 2000. Vol. 19. N 11. P. 2725–2734.
14. Havas M. Aluminum bioaccumulation and toxicity to *Daphnia magna* in soft water at low pH // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1985. Vol. 42. N 11. P. 1741–1748.
15. Klüttgen B., Dülmer U., Engels M., Ratte H.T. ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton // Water Res. 1994. Vol. 28. N 3. P. 743–746.
16. Adema D.M.M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests // Hydrobiol. 1978. Vol. 59. N 2. P. 125–134.
17. Matorin D.N., Bratkovskaya L.B., Yakovleva O.V., Venediktov P.S. Biotesting of water toxicity according to the ratio of microalgae consumption by daphnia detected with chlorophyll fluorescence // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2009. Vol. 64. N 3. P. 115–120.
18. Gapochka L.D., Drozhzhina T.S., Isakova E.F., Shavyrina O.B., Gapochka M.G., Pavlova A.S. Effects of irradiation by the low-intensity electromagnetic field of the millimetric range on the *Daphnia magna* culture at various developmental stages // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 2. P. 43–48.
19. Smirnov N. N. Physiology of the Cladocera. 2nd Edition. London: Academic Press, 2017. 417 pp.
20. Yusupov V.I., Vorobyeva O.V., Rochev Y.A., Bagratashvili V.N. Influence of hydrodynamic processes generated by 1.94-mm pulsed laser radiation on *Daphnia magna* crustaceans // Acoustic Phys. 2019. Vol. 65. N 1. P. 84–94.
21. Жмур Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний (ФР 1.1.39.2007–03–222). М.: АКВАРОС, 2007. 52 с.
22. Ritz C., Baty F., Streibig J.C., Gerhard D. Dose-response analysis using R // PLoS One. 2015. Vol. 10. N 12: e0146021

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 24.09.2020 г.

Принята в печать 16.10.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Acute toxicity of aluminum chloride to *Daphnia magna* Straus depending on the chemical composition of water

O.V. Vorobieva^{1,2,*} , E.F. Isakova¹ , M.A. Zaec¹ , A.Yu. Merzelikin¹ ,
T.A. Samoilova² 

¹Department of General Ecology and Hydrobiology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gory 1–12, 119234, Moscow, Russia;

²Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography,
Verkhnyaya Krasnoselskaya St., 17, 107140, Moscow, Russia

*e-mail: olvorobieva@rambler.ru

The toxicity of water pollutants depends not only on their concentration, but also on the chemical composition of water – the concentration of calcium and magnesium, humic acids, etc., which should be taken into account when extrapolating the results of biotesting to natural conditions. The sensitivity of *Daphnia magna* to acute toxicity of aluminum chloride was evaluated in natural and artificial water with different parameters of hardness. Aluminum toxicity decreased both in artificial and natural water with an increase in water hardness. However, within the same range of water hardness aluminum toxicity decreased significantly less in artificial water than in natural water. In artificial water, an increase in hardness from 0.017 to 0.524 °e led to an increase in the value of the 48-h half-lethal concentration of

aluminum by 1.57 times. In natural water a similar increase in hardness (0.017–0.692 °e) led to a 6-fold decrease in this indicator. Such differences may be associated with the influence of other hydrochemical factors of the studied water types. Thus, when conducting biotesting for the purpose of environmental regulation, artificial water cannot serve as a fully adequate replacement for natural water which chemical composition is affected by spatial heterogeneity.

Keywords: *Daphnia magna*, aluminum, bioassay, toxicity, water hardness, sensitivity of test organisms

Сведения об авторах

Воробьева Ольга Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ, специалист отдела рыбохозяйственной экологии ВНИРО. Тел. 8-495-939-27-91; e-mail: olvorobieva@rambler.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4265-892X>

Исакова Евгения Филипповна — канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-91; e-mail: evgenia_isakova@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6120-8129>

Заец Маргарита Александровна — студент биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-91; e-mail: zaetzrita@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3773-5177>

Мерзеликин Александр Юрьевич — аспирант кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-91; e-mail: source45@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2244-7669>

Самойлова Татьяна Александровна — канд. биол. наук, науч. сотр. отдела рыбохозяйственной экологии ВНИРО. Тел. 8-499-264-90-98; e-mail: asamojlova@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4684-0975>

МНЕНИЕ

УДК 591.56+597.556

Забота о потомстве у рыбы-ползуна (*Anabas testudineus*): ошибка или утерянные данные?

Д.Д. Зворыкин 

Лаборатория поведения низших позвоночных, Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова, РАН,
Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33
e-mail: d.zvorykin@gmail.com

Ползуновидные рыбы представляют собой уникальную группу, большинство представителей которой проявляют многообразную по формам заботу о потомстве. Реконструкция эволюции репродуктивных стратегий ползуновидных проблематична, что, в частности, связано с отсутствием достоверных подтверждений родительской заботы у ряда ее представителей, наиболее известным из которых является анабас. Более того, существуют прямые противоречия между литературными источниками по данному вопросу. В кратком обзоре представлен анализ вероятных причин разногласий, от прояснения которых зависит дальнейшее развитие представлений о филогенезе жизненных стратегий в группе ползуновидных и о возможных направлениях эволюционных преобразований размножения рыб в целом.

Ключевые слова: рыба-ползун, *Anabas*, забота о потомстве, репродуктивная стратегия, филогенез жизненных стратегий, адекватная методика

Подотряд ползуновидных рыб (Anabantoidei) характеризуется высоким разнообразием репродуктивных стратегий, а большинству его представителей присуща развитая забота о потомстве, проявляемая в различных формах, включая строительство гнезда и оральную инкубацию икры. В то же время существует небольшая группа ползуновидных, у которых родительская забота не отмечена. Один из самых известных таких видов – анабас, или рыба-ползун (*Anabas testudineus*). Это массовый обитатель пресных вод Южной и Юго-Восточной Азии с мелкой и многочисленной икрой, типичной преимущественно для пелагофилов, не заботящихся о потомстве.

Несмотря на широкое распространение рыбы-ползуна, естественный нерест этих рыб почти не изучен. При этом ни в одном из задокументированных описаний нереста анабаса не зарегистрировано никаких элементов родительского поведения [1–3]. В то же время в целом ряде фундаментальных трудов содержатся не подтвержденные конкретными данными утверждения о наличии у рыбы-ползуна примитивной заботы об икре [4, 5].

Данные филогенетического анализа не позволяют однозначно интерпретировать эволюцию родительской заботы у ползуновидных рыб [6, 7]. Наиболее вероятно, что забота о потомстве либо (1) является плезиоморфным признаком данной группы, утраченным впоследствии в некоторых кладах, либо (2) она трижды возникала независимо [6]. Анабас занимает в группе базальное поло-

жение по отношению как к ктенопомам (*Stenopoma* spp.), не проявляющим заботу о потомстве, так и микроктенопомам (*Microctenopoma* spp.), у которых данный феномен отмечен. Такое положение обуславливает важность вопроса о способе размножения анабаса для дальнейшего развития филогенетических представлений [8]. В частности, если бы было подтверждено наличие у него факультативной родительской заботы, это явилось бы свидетельством в пользу первого варианта эволюционного сценария. В свою очередь, для развития представлений об эволюции репродуктивных стратегий у животных в целом это было бы важным и сравнительно немногочисленным примером редукции заботы о потомстве.

В связи с этим прояснение ситуации с противоречивыми данными представляется важным и актуальным. В данной статье представлена попытка реконструкции истории сообщений о наличии у рыбы-ползуна заботы о потомстве, а также краткий анализ современной ситуации.

Происхождение и распространения сведений о родительской заботе у анабаса

Во второй половине XX в. известный исследователь Юджин Балон предложил и долгое время развивал систему так называемых репродуктивных гильдий у рыб [5, 9–11]. Она была популярна на протяжении нескольких десятилетий и в целом основана на достаточно точных фактах. Тем не менее, именно в ней впервые

появляется упоминание о заботе о потомстве у анабаса. В ранних версиях этой системы [9] Балон указывает *Anabas* spp. в качестве типичных представителей экологической группы рыб, не строящих гнезда, нерестящихся в пелагиале, но ухаживающих за своей икрой, имеющей положительную плавучесть (экологическая группа В.1.4 – пелагофилы, по версии 1975 г.).

Можно было бы предположить, что автор имеет в виду не рыбу-ползуна, а каких-то иных анабасов, коль скоро он говорит об *Anabas* spp., но сделать это затруднительно. Сейчас род *Anabas* насчитывает два плохо различимых вида, валидность одного из которых (*A. cobojius*) вызывает сомнения. В литературе 70–80-х гг. XX в. под этим родовым названием фигурировали и некоторые другие ползуновидные рыбы, большинство которых впоследствии были перемещены в роды *Stenopoma* и *Microtenopoma*. При этом микроктенопомы действительно заботятся о потомстве, это их родовой признак. В частности, это относится к «бывшим анабасам» *Microtenopoma congitum* и *M. lineatum*. Однако важное отличие заключается в том, что они строят типичные для многих ползуновидных рыб пенные гнезда [12], то есть не подходят под данное Балонем описание пелагофилов и относятся к совершенно другой группе в его системе. В более поздних версиях своей системы Балон не только не исправляет это сомнительное место, но, наоборот, уже в явном виде указывает конкретный вид – *Anabas testudineus* [5].

В 1987 г. выходит монография еще одного крупного ихтиолога – «Экологические исследования сообществ тропических рыб» Розмари Лоу-

Макконелл [4]. В одной из глав этой книги, пользующейся заслуженным авторитетом до сих пор, Лоу-Макконелл излагает систему Ю. Балона и вслед за ним приводит в качестве примера рыб, ухаживающих за свободно плавающей икрой, «некоторые виды *Channa* и *Anabas*». Однако в другом месте той же книги автор пишет, что «у *Anabas testudineus* и *Helostoma temminckii* очень мелкие пелагические икринки остаются без родительской охраны». Иначе говоря, автор знает, что у *Anabas testudineus* забота о потомстве неизвестна, но допускает, что у каких-то других представителей этого рода данный тип поведения может существовать.

Сходная ситуация с важной обзорной монографией Робина Уэлкомма [13], в которой автор также воспроизводит систему Балона и вслед за ним в качестве примера рыб, ухаживающих за плавающей икрой, указывает *Anabas* spp. Постепенно данное утверждение широко распространяется в литературе и находит отражение в учебниках [14, 15], определителях [16] и справочниках [17, 18]. Основные известные упоминания и даже описания якобы существующей заботы о потомстве у анабаса за последние 50 лет представлены в хронологическом порядке в таблице.

Откуда Балон мог взять информацию про анабаса? В самой первой версии своей системы [9] он приводит ссылку на работу Джорджа Барлоу с соавторами [19], в которой сказано, что ползуновидные рыбы демонстрируют широкий диапазон форм родительской заботы и «некоторые из них, такие как род *Anabas*, не строят пенное гнездо, а их икра просто расплывается по поверхности воды». Этот пассаж звучит несколько двусмысленно,

Таблица

Основные упоминания заботы о потомстве у анабаса в литературе в хронологическом порядке

Публикация, источник	Таксон	Суть утверждения	На кого ссылка	Тип публикации
Kühme, не позднее 1968 г.	неизвестно	неизвестно	нет; вероятно, личное наблюдение	личное сообщение
[19]	род <i>Anabas</i>	двусмысленное высказывание (см. текст)	Kühme, pers. comm.	статья
[9]	<i>Anabas</i> spp.	и самец, самка охраняют икру и личинок	[14]	статья
[11]	<i>Anabas testudinosus</i> [sic]	В.1.1. заботящиеся о потомстве в пелагиали	нет	глава в книге
[13]	<i>Anabas</i> spp.	В.1 охраняющие потомство пелагофилы	[10]	книга
[4]	некоторые виды <i>Anabas</i>	охраняют плавающую икру	[11]	книга
[5]	<i>Anabas testudineus</i>	В.1 ухаживающие за кладкой	нет	статья
[35]	<i>Anabas testudineus</i>	после нереста самец охраняет икру и отгоняет самок	нет	книга
[14]	<i>Anabas scandens</i> = <i>A. testudineus</i>	самец проявляет родительскую заботу;	нет	учебник
[17] не позднее 2004 г. и по настоящее время	<i>Anabas testudineus</i>	охраняет икру на поверхности бедной кислородом воды	[5]	электронная научная база данных
[36]	<i>Anabas testudineus</i>	охраняет икру на поверхности бедной кислородом воды	[5, 17]	книга
[15]	<i>Anabas testudineus</i>	самец проявляет родительскую заботу	нет	учебник
[37]	<i>Anabas testudineus</i>	охраняют свою икру	нет	статья
[18]	<i>Anabas testudineus</i>	охраняет икру на поверхности бедной кислородом воды	[5]	оценка инвазионного риска
[16]	<i>Anabas testudineus</i>	родители охраняют икру до вылупления	нет	определитель

поскольку непонятно, во-первых, про каких именно анабасов идет речь, а во-вторых, икра, расплывающаяся по поверхности воды, все-таки охраняется родителями (коль скоро речь идет о многообразии форм родительской заботы) или нет.

Балон трактует это однозначно и пишет про икринки анабасов буквально следующее: «Отложенные на поверхности воды в открытых промежутках между мелководными растениями, они плавают скоплениями и, перемещаемые ветром, часто дрейфуют в отдаленные места. И самец, и самка охраняют яйца и личинки» [9]. То есть он воспроизводит информацию Барлоу и даже дополняет ее подробностями, о происхождении которых ничего не сообщает. В свою очередь сам Барлоу, судя по всему, тоже не видел размножения рыбы-ползуна, а описывает ее со ссылкой на личное сообщение Кюме (Kühme, personal communication to George Webber Barlow). По всей видимости, речь идет об известном немецком этологе Вольфдитрихе Кюме.

Таким образом, вкратце последовательность событий была, видимо, такова: Кюме сообщил что-то Барлоу про каких-то анабасов. Барлоу пересказал это в своей статье, посвященной другим рыбам из рода *Badis*. Балон это прочитал и включил в свою систему репродуктивных гильдий. Спустя несколько лет Балон начинает писать не *Anabas* spp., а *Anabas testudineus*. Система Балона вместе с анабасом, якобы заботящимся о потомстве, начинает транслироваться в научной литературе и в XXI в. попадает в справочники, определители и учебники для университетов.

Если вернуться к самому началу этих событий, возникает вопрос — что же на самом деле наблюдал Кюме и о чем он рассказывал Барлоу? Кюме — этолог классической школы, его наблюдательность и аккуратность не подлежат никаким сомнениям. Он действительно исследовал репродуктивное поведение различных ползуновидных рыб и опубликовал несколько работ по этой теме, в частности чрезвычайно подробное и обстоятельное сравнение двух видов рода *Betta*, один из которых инкубирует икру во рту, а другой строит пенное гнездо [20]. Маловероятно, что Кюме сообщил коллеге информацию, в которой не был уверен. Джордж Барлоу — тоже авторитетный специалист по поведению рыб. Кто и в какой момент ошибся и была ли ошибка?

Особенности методики исследований как возможная причина противоречий

Как задачи, так и методы современных исследований размножения рыбы-ползуна существенно отличаются от тех, которые использовались в середине XX столетия. За первые 20 лет текущего века уже вышло около 8 тыс. публикаций, так или иначе связанных с биологией анабаса или хотя бы

упоминающих его [21]. Однако ни в одной из известных работ не была предпринята попытка создать условия для реализации естественного репродуктивного поведения этих рыб. Более того, поведение вообще редко является предметом современных исследований данного вида, а протокол этих немногочисленных исследований часто неудачен. Например, было показано, что такие исследования могут приводить к некорректным результатам по той причине, что в них осуществляется попытка исследовать поведение стайных животных в условиях одиночного тестирования [22]. Репродуктивное поведение рыб также весьма чувствительно к условиям и его изучение в лаборатории может приводить к появлению артефактов [23].

Отдельную проблему представляет использование гонадотропных препаратов для стимуляции нереста. Действительно, размножение анабасов в аквариумах представляет собой специфическую методическую задачу и часто требует длительной подготовки. Тем не менее, как представляется, применение гормональной стимуляции может вообще лишить поведенческие наблюдения всякого смысла. Показано, например, что даже использование одного и того же препарата в разных схемах оказывает разное влияние на репродуктивное поведение анабаса [24]. Известно лишь несколько описаний нереста этих рыб, осуществленных в аквариумах без использования искусственной стимуляции [1, 3], и ни одного опубликованного описания нереста в природе.

Одной из причин, по которой исследователи используют максимально упрощенную методику работы, является распространенное, но ошибочное представление о репродуктивной стратегии рыб как о консервативном видоспецифичном комплексе признаков. Из этого следует допущение о том, что нерестовое и постнерестовое поведение мало меняется в разных условиях. В действительности многочисленные исследования показывают, что это не так. Репродуктивная стратегия многих видов отличается высокой пластичностью, служащей основой для различных ситуационно зависимых альтернативных тактик размножения [25, 26]. Даже полный отказ от заботы о потомстве, так называемое родительское дезертирство, является частым вариантом альтернативной тактики у многих животных [27, 28]. Наконец, для ряда низших позвоночных, включая рыб, подтверждена факультативная родительская забота, проявление или отсутствие которой зависит от комплекса факторов [29, 30].

Совокупность черт жизненной стратегии анабаса с некоторыми оговорками характеризует его как рыбу, для которой с наибольшей вероятностью можно ожидать следования так называемой оппортунистической стратегии [31], включающей в себя отсутствие заботы о потомстве. Одна-

ко ряд особенностей биологии рыбы-ползуна указывает на возможность проявления ею родительского поведения [8]. Похожая ситуация характерна для змееголовов (семейство Channidae), относящихся к тому же отряду ползунообразных (Anabantiformes) и имеющих во многом сходную с анабасом репродуктивную биологию, включая мелкую плавучую икру, быстрое развитие и пр. Но с этими рыбами ситуация обратная — они почти всегда проявляют заботу о потомстве [32, 33], однако иногда данное поведение полностью отсутствует [34]. Возвращаясь к проблеме гормональной стимуляции нереста, важно подчеркнуть, что у змееголовов она может являться одной из причин исчезновения родительского поведения [34].

Таким образом, нельзя исключать вероятность того, что неопубликованные наблюдения Кюме позволили ему зарегистрировать поведение анабаса, которое не проявляется в условиях современных экспериментальных подходов. Возможно,

что, в зависимости от условий размножения, рыба-ползун может как проявлять какие-то элементы родительской заботы, так и не проявлять их. В условиях современных лабораторных экспериментов такое поведение не проявляется. Соответственно, вопрос о родительской заботе у анабаса должен пока считаться открытым, а его прояснение требует новых, корректно спланированных, исследований.

Работа выполнена в рамках программы Эколан Э-3.2. Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра. Автор благодарит Динь Тхи Хай Йен и Во Тхи Ха за многолетнее сотрудничество в исследованиях анабаса, Д.С. Павлова, К.Ф. Дзержинского и анонимного рецензента за плодотворное обсуждение отдельных тезисов этой рукописи, а также заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mookerjee H.K., Mazumdar S.R. On the life history, breeding and rearing of *Anabas testudineus* Bloch // J. Dep. Sci. Cal. Univ. 1946. Vol. 2. P. 101–140.
2. Sarkar U.K., Deepak P.K., Kapoor D., Negi R.S., Pau S.K., Sing S. Captive breeding of climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) with Wova-FH for conservation and aquaculture // Aquac. Res. 2005. Vol. 36. N 10. P. 941–945.
3. Zworykin D.D. Reproduction and spawning behavior of the climbing perch *Anabas testudineus* (Perciformes, Anabantidae) in an aquarium // J. Ichthyol. 2012. Vol. 52. N 6. P. 379–388.
4. Lowe-McConnell R.H. Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1987. 382 pp.
5. Balon E.K. Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes // Guelph Ichthyol. Rev. 1990. Vol. 1. P. 1–48.
6. Rüber L., Britz R., Zardoya R. Molecular phylogenetics and evolutionary diversification of Labyrinth fishes (Perciformes: Anabantoidei) // Syst. Biol. 2006. Vol. 55. N 3. P. 374–397.
7. Wu F., He D., Fang G., Deng T. Into Africa via docked India: a fossil climbing perch from the Oligocene of Tibet helps solve the anabantid biogeographical puzzle // Sci. Bull. 2019. Vol. 64. N 7. P. 455–463.
8. Zworykin D.D. Phylogenesis of reproductive strategies in labyrinth fishes (Anabantoidei) and their sister groups // Biol. Bull. Rev. 2017. Vol. 7. N 5. P. 428–441.
9. Balon E.K. Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition // J. Fish. Res. Board Can. 1975. Vol. 32. N 6. P. 821–864.
10. Balon E.K. Additions and amendments to the classification of reproductive styles in fishes // Env. Biol. Fish. 1981. Vol. 6. N 3–4. P. 377–389.
11. Balon E.K. Patterns in the evolution of reproductive styles in fishes // Fish reproduction: strategies and tactics / Eds. G.W. Potts and R.J. Wootton. London: Acad. Press, 1984. P. 35–53.
12. Norris S.M. *Microctenopoma uelense* and *M. nigricans*, a new genus and two new species of anabantid fishes from Africa // Ichthyol. Explor. Fres. 1995. Vol. 6. N 4. P. 357–376.
13. Welcomme R.L. River fisheries. F.A.O. Fisheries Technical Paper 262. Rome: F.A.O. U.N., 1985. 330 pp.
14. Verma P.S. A manual of practical zoology chordates. 10th edition. Ram Nagar, New Delhi: S. Chand & Co. Ltd., 2000. 627 pp.
15. Lal S.S. Practical zoology: vertebrate. Vol. 3. Gangotri: Rastogi Publications, 2009. 485 pp.
16. Freshwater pest identification guide. Department of agriculture and water resources, Australian Government, 2019. 14 pp.
17. FishBase [Электронный ресурс]. Дата обновления: 12.2019. URL: <https://www.fishbase.se> (дата обращения: 25.07.2020).
18. Climbing perch (*Anabas testudineus*) // Ecological risk screening summary. U.S. Fish & Wildlife Service. F.A.C. program, 2019. 14 pp.
19. Barlow G.W., Liem K.F., Wickler W. Badidae, a new fish family — behavioural, osteological, and developmental evidence // J. Zool. 1968. Vol. 156. N 4. P. 415–447.
20. Kühme W. Verhaltensstudien am maulbrütenden (*Betta anabatoideus* Bleeker) und am nestbauenden Kampffisch (*B. splendens* Regan) // Z. Tierpsychol. 1961. Vol. 18. N 1. P. 33–55.
21. Зворыкин Д.Д. Некоторые тенденций пресноводной тропической аквакультуры и их влияние на исследования репродуктивной биологии анабаса *Anabas testudineus* (Anabantidae) // Рыб. хоз. 2020. № 4. С. 85–89.
22. Zworykin D.D. The behavior of climbing perch, *Anabas testudineus*, with novel food in individual and social conditions // J. Ichthyol. 2018. Vol. 58. N 2. P. 260–264.
23. Candolin U., Voigt H.-R. No effect of a parasite on reproduction in stickleback males: a laboratory artefact? // Parasitology. 2001. Vol. 122. N 4. P. 457–464.
24. Behera S., Ahmed A.S., Kumar S., Gogoi R., Jomang O., Baksi S. Courtship behaviour and breeding success of climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch) in

three different breeding sets with the application of a synthetic hormone (WOVA-FH) // *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2016. Vol. 6. N 1. P. 1–6.

25. Lee J.S.F. Alternative reproductive tactics and status-dependent selection // *Behav. Ecol.* 2005. Vol. 16. N 3. P. 566–570.

26. Taborsky M., Brockmann H.J. Alternative reproductive tactics and life history phenotypes // *Animal behaviour: evolution and mechanisms* / Ed. P.M. Kappeler. Berlin: Springer, 2010. P. 537–586.

27. McNamara J.M., Houston A.I., Szekely T., Webb J.N. Do parents make independent decisions about desertion? // *Anim. Behav.* 2002. Vol. 64. N 1. P. 147–149.

28. Lehtonen T.K., Wong B.B.M., Lindström K., Meyer A. Species divergence and seasonal succession in rates of mate desertion in closely related Neotropical cichlid fishes // *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2010. Vol. 65. N 4. P. 607–612.

29. Warner R.R., Wernerus F., Lejeune P., van den Berghe E. Dynamics of female choice for parental care in a fish species where care is facultative // *Behav. Ecol.* 1995. Vol. 6. N 1. P. 73–81.

30. Pombal J.P., Martins M., Haddad C.F.B. Escalated aggressive behaviour and facultative parental care in the nest building gladiator frog, *Hyla faber* // *Amphibia–Reptilia.* 1998. Vol. 19. N 1. P. 65–73.

31. Wootton R.J., Smith C. Reproductive biology of teleost fishes. Chichester: John Wiley & Sons, 2015. 496 pp.

32. Roberts T.R. The freshwater fishes of Western Borneo (Kalimantan Barat, Indonesia). San Francisco: California Academy of Sciences, 1989. 210 pp.

33. Haniffa M.A., Nagarajan M., Marimuthu K., Raj A.J.A. Embryonic and larval development of spotted murrel, *Channa punctatus* (Bloch) // *Indian J. Fish.* 2003. Vol. 50. N 3. P. 355–362.

34. Parameswaran S., Murugesan V.K. Observations on the hypophysation of murels (Ophicephalidae) // *Hydrobiologia.* 1976. Vol. 50. N 1. P. 81–87.

35. Shrestha T.K. Resource ecology of the Himalayan waters: a study of the ecology, biology and management strategy of fresh waters of Nepal. Kathmandu: Steven Simpson Books, 1995. 645 pp.

36. Vann L.S., Baran E., Phen C., Thang T.B. Biological reviews of important Cambodian fish species. Vol. 2. Phnom Penh: WorldFish Center, 2006. 154 pp.

37. Rajan D.S. An evaluation of the effect of a detergent on dissolved oxygen consumption rate of *Anabas testudineus* // *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2015. Vol. 2. N 6. P. 46–48.

Поступила в редакцию 27.07.2020 г.

После доработки 07.09.2020 г.

Принята в печать 23.09.2020 г.

OPINION ARTICLE

Parental care in the climbing perch (*Anabas testudineus*): confusion or lost data?

D.D. Zworykin 

Laboratory of Lower Vertebrates Behaviour, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution,
Leninsky pr. 33, Moscow, 119071, Russia
e-mail: d.zworykin@gmail.com

Anabantoid fishes form a unique group, most of which are characterized by diverse forms of parental care. Reconstruction of the reproductive strategies evolution in anabantoids remains a challenge. This is partly due to the lack of reliable evidence of parental care in a number of its representatives, the most famous of which is the climbing perch. Moreover, apparent contradictions between literary sources frequently occur on the subject. This brief overview attempts to analyze the situation and identify the likely causes of disagreement. The further development of understanding of the life strategies phylogeny in the group, as well as concept of evolutionary transitions among parental care modes in fishes in general, depend on clarification of this situation.

Keywords: climbing perch, *Anabas*, parental care, reproductive strategy, phylogeny of life-history strategies, adequate approach

Сведения об авторе

Зворыкин Дмитрий Дмитриевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории поведения низших позвоночных Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-495-952-40-17, e-mail: d.zworykin@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6198-3299>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 576.89

Структура оболочек вокруг метацеркарий трематод *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) во втором промежуточном хозяине**Е.М. Скоробрехова** *Институт биологических проблем Севера, ДВО РАН, Россия, 685000, г. Магадан, ул. Портовая, д. 18
e-mail: skorobrechova@mail.ru*

С использованием методов световой и трансмиссионной электронной микроскопии изучено строение капсулы и цисты, окружающих метацеркарии трематод *Podocotyle atomon* во вторых промежуточных хозяевах — *Locustogammarus locustoides* (Brandt, 1851) и *Spinulogammarus ochotensis* (Brandt, 1851). Показано, что образованная тканью хозяина капсула состоит из двух слоев: 1) электронно-светлого, рыхловатого, внутреннего и 2) электронно-темного, деструктурированного наружного слоя, включающего небольшое количество клеток и их фрагментов. Циста, образуемая самим паразитом, организована в виде единого аморфного слоя. Предполагается, что внутренний слой капсулы подкотилий образуется путем дегенерации и трансформации участка мышечного волокна амфиподы, в котором локализуется личинка, а ее наружный слой представлен отложениями пигмента.

Ключевые слова: ультраструктура, амфиподы, метацеркарии, циста, капсула, *Podocotyle atomon*

Трематоды *Podocotyle atomon* являются широко распространенными паразитами кишечника морских рыб. Вторыми промежуточными хозяевами этих трематод являются разные ракообразные; в частности, в бассейне Охотского моря их метацеркарии обнаруживали в амфиподах не менее чем 10 видов [1].

При описании тотальных препаратов метацеркарий *P. atomon* отмечается, что в теле ракообразных эти паразиты заключены в две легко отделяемые друг от друга оболочки: внутреннюю прозрачную цисту (формируемую паразитом) и наружную пигментированную капсулу (формируемую хозяином) [1]. Сведения о внутреннем строении цисты отсутствуют, о капсуле же имеются противоречивые данные. Согласно Успенской [2] на свето-микроскопических препаратах капсула состоит из нескольких слоев коричневого пигмента при отсутствии в ее составе клеточных элементов. Джеймс [3] при проведении эксперимента по заражению различных видов амфипод отметил, что инцистированные метацеркарии покрываются толстой фиброзной оболочкой. Коие [4] в эксперименте с амфиподами *Gammarus* sp., используя метод сканирующей электронной микроскопии, пришла к выводу, что капсула является видоизмененной мышечной тканью ракообразного. Цель настоящей работы состояла в изучении структуры цисты и капсулы метацеркарий *P. atomon* с применением световой и трансмиссионной электронной микроскопии.

Материалы и методы

Метацеркарии *P. atomon* были извлечены из амфиподов *L. locustoides* (Brandt, 1851) и *S. ochotensis* (Brandt, 1851), собранных в прибрежных участках бухты Нагаева Охотского моря. Личинок, окруженных цистой и капсулой, фиксировали и заключали в эпонаралдит в соответствии со стандартной электронно-микроскопической методикой. Полутонкие срезы (1–2 мкм), окрашивали смесью метиленового синего и кристаллического фиолетового и просматривали под световым микроскопом Olympus CX 41. Ультратонкие срезы изучали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 PLUS (JEOL, Япония).

Результаты и обсуждение

Всего было изучено 2237 амфиподов (853 *S. ochotensis* и 1384 *L. Locustoides*), из которых оказались зараженными 422 и 466 соответственно. Метацеркарии редко располагались в мышцах конечностей, чаще в гемоцеле, из которого свободно выделялись в процессе вскрытия ракообразного (рис. 1А).

Морфология капсулы. Капсулы с заключенными в них метацеркариями имели удлиненную (реже округлую) форму. Количество капсул, обнаруживаемых в одном рачке, варьировало от одного до семнадцати. Цвет их варьировал от светло-коричневого до темно-бурого, иногда черного (рис. 1Б), но в некоторых случаях капсулы были светлыми (рис. 1В). В одном рачке обнаружива-

лись как однотипные, так и одновременно светлые и окрашенные капсулы. Длина удлинённых капсул составляла приблизительно 0,5–1,0 мм, а ширина 0,2–0,4 мм, диаметр округлых капсул варьировал от 0,2 до 0,4 мм. В удлинённых капсулах гельминты располагались как в центре, так и ближе к одному из краёв (рис. 1Г). В одной капсуле обычно располагалась одна инцистированная метацеркария, однако нередко в общей капсуле находили 2–4 личинок, каждая из которых была заключена в собственную цисту.

Строение стенки капсулы у подокоотилей из обоих исследованных видов амфипод сходно. В ее составе на полутонких срезах видны два отчетливых слоя: 1) внутренний – рыхловатый, светло-окрашенный и 2) наружный – деструктурированный, темный (рис. 1Г, 2). Основу внутреннего слоя капсулы составляют крупные, удлинённые тяжи, чаще бесструктурного, иногда тонкофибрилярного материала невысокой электронной плотности, разделенные более светлыми узкими участками (рис. 3А). В строении этого слоя редко встречались мелкие мембраноподобные образования и элект-

тронно-плотные тела, напоминающие липидные капли. Наружный слой капсулы состоит из электронно-плотной бесструктурной массы, напоминающей отложения пигмента (меланина) (рис. 3Б). На одних препаратах этот слой был тонким и слабо выраженным (рис. 1Г), на других – составлял более половины толщины стенки капсулы (рис. 2). Можно предполагать, что толщина наружного слоя капсулы связана с длительностью ее формирования. Если это предположение верно, то тогда светлая капсула с метацеркарией, вероятно, находится на ранней стадии формирования ее наружного слоя, и пигмент только начинает откладываться. В скоплениях пигмента наружного слоя были найдены фрагменты клеток (рис. 3В). У некоторых капсул небольшое количество пигмента было обнаружено внутри содержимого внутреннего слоя капсулы. На периферии капсулы изредка встречались небольшие группы клеток с выраженными признаками деструкции (рис. 3Г). В этих клетках были выявлены ядра с крупными скоплениями гетерохроматина вдоль внутренней мембраны, а также плотные фаголизосомы и мембранные тельца.

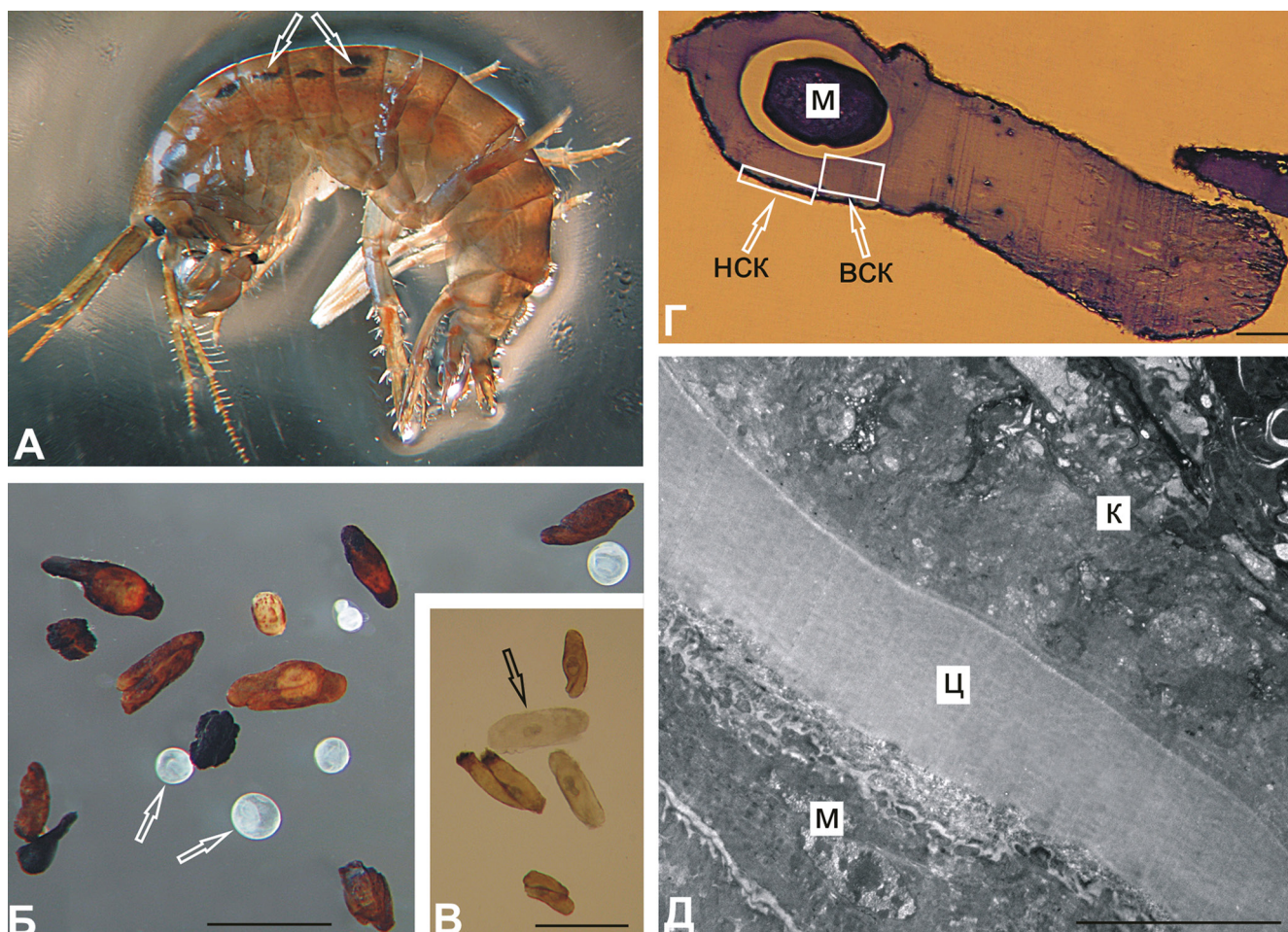


Рис. 1. А. *Spinulogammarus ochotensis*, сквозь покровы которого видны метацеркарии *Podocotyle atomon*, заключенные в пигментированные капсулы (стрелки). Б, В. Инкапсулированные метацеркарии, выделенные из гемоцеля амфиподы. Стрелками показаны: на рис. Б – личинки в прозрачных цистах, извлеченные из капсул, рис. В – метацеркария, заключенная в светлую капсулу. Г. Полутонкий срез инкапсулированной метацеркарии. Циста плотно прилегает к личинке, поэтому на снимке не видна. Д. Ультратонкий срез поверхностного участка метацеркарии и окружающих ее цисты и капсулы. ВСК – внутренний слой капсулы, К – капсула, М – метацеркария, НСК – наружный слой капсулы, Ц – циста. Линейка: Б, В – 1 мм, Г – 50 мкм, Д – 10 мкм.

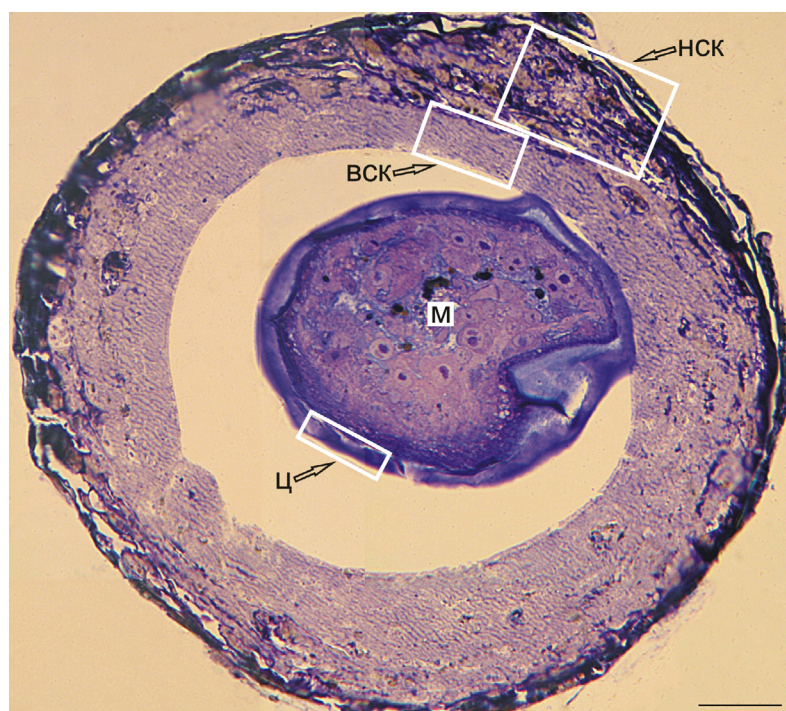


Рис. 2. Полутонкий срез инкапсулированной метацеркарии *P. atomon*. ВСК – внутренний слой капсулы, М – метацеркария, НСК – наружный слой капсулы, Ц – циста. Линейка: 20 мкм.

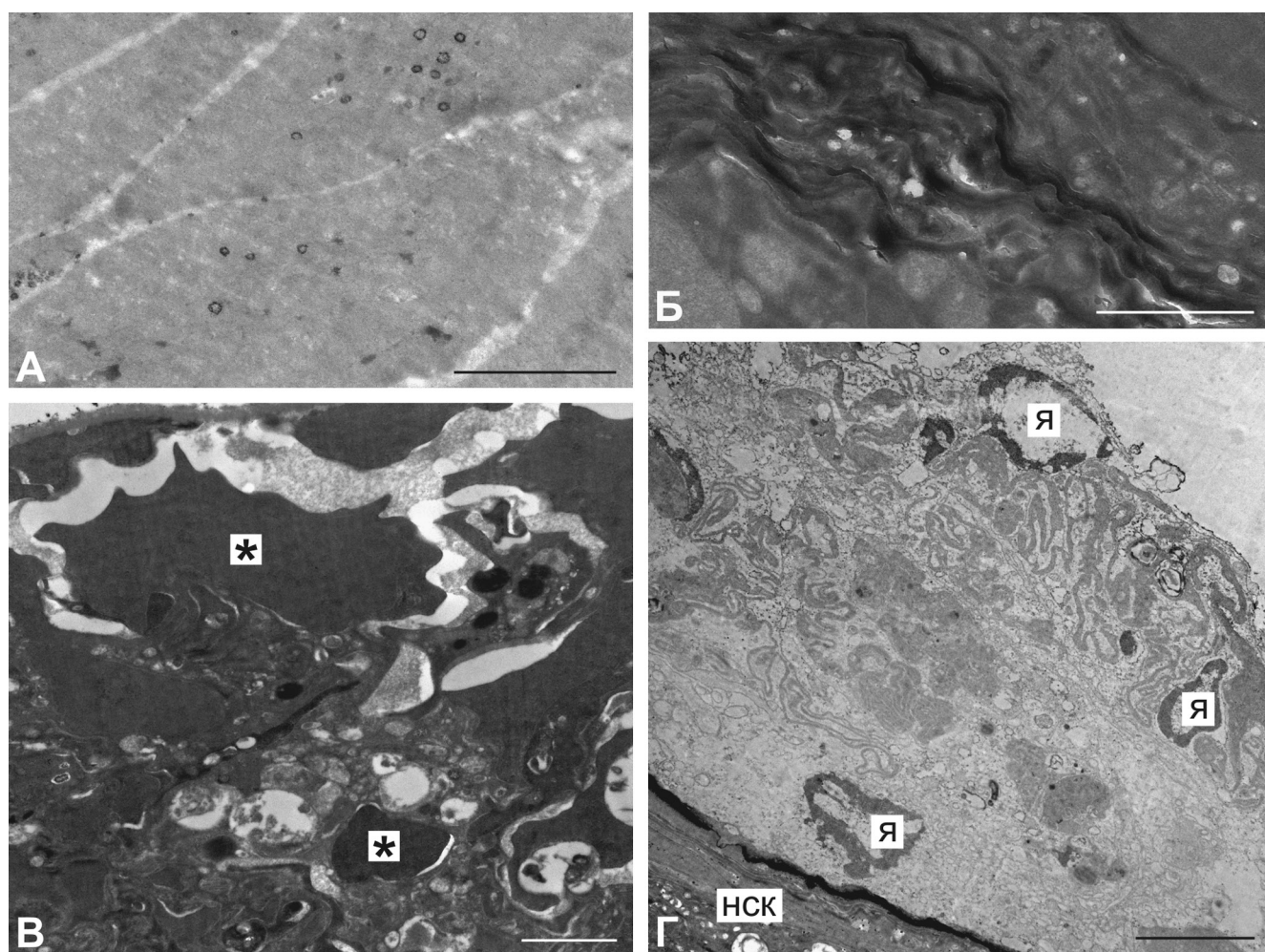


Рис. 3. А. Ультратонкий срез внутреннего слоя капсулы, образованного дегенерировавшим материалом. Б–Г. Ультраструктура наружного слоя капсулы. НСК – наружный слой капсулы, Я – ядра. Звездочками показаны фрагменты клеток. Линейка: А–В – 2 мкм, Г – 5 мкм.

Образование капсулы рассматривается как важнейшая адаптация тканевых паразитов к иммунному ответу хозяина. В отличие от других видов опекоелидных метацеркарий, например, *P. reflexa* [5] и *Allopodocotyle leptomis* [6, 7], капсула которых состоит из нескольких слоев клеток хозяина, метацеркарии *P. atomon* окружены капсулой преимущественно из неклеточного материала. Внутренний слой капсулы образован электронно-светлым тонковолокнистым материалом, а наружный состоит из электронно-плотного вещества, напоминающего меланин, с включением клеток хозяина и/или их фрагментов. Согласно данным Коие [4], метацеркарии *P. atomon* локализуются в мышцах спинной части амфипод и инкапсулируются материалом, образующимся путем дегенерации и трансформации прилегающего к паразиту участка мышечной ткани беспозвоночного. В дальнейшем этот участок мышечной ткани вместе с заключенной внутри личинкой выделяется в гемоцель. Структурные изменения, включая дегенеративные, мышечных клеток беспозвоночных могут вызывать и другие виды паразитов. Например, в мышечных клетках комаров *Aedes aegypti*, пораженных личинками нематод *Brugia pahangi*, ядра и митохондрии увеличиваются в размере, а миофибриллы, прилегающие к паразитам, уплотняются по мере их роста [8]. Личинки этого же вида нематод в комарах *Anopheles quadrimaculatus* окружаются плотным слоем диссоциированной саркоплазмы, включающей большое количество клеточных мембран и везикул [9]. Указываются и более обширные изменения мышечных волокон в виде полного их разрушения, связанного, главным образом, с миграцией зрелых филярий в гемоцель комаров [8]. Отмечается, что ядра и митохондрии дегенерирующих мышечных волокон разрушаются, после чего удаляются макрофагами, а миофибриллы распадаются на фрагменты, которые сливаются и образуют аморфную массу. В составе исследованных нами капсул подокотилей мы не обнаружили структурных компонентов мышечной ткани, поскольку образующий их материал был дегенерирован. В то же время, при сравнении ультратонкого строения разрушенных мышечных волокон насекомых, подвергнутых инвазирующему действию вышеупомянутого вида микрофилярий нематод, и внутреннего слоя капсулы подокотилей мы наблюдали их сходство, заключающееся в общей невысокой электронной плотности и рыхлой организации образующего их вещества. Однако для подтверждения гипотезы о мышечной природе этого слоя необходимы дополнительные экспериментальные исследования с поэтапным изучением гистологических срезов.

Особенностью строения наружного слоя капсулы *P. atomon* является входящее в его состав электронно-плотное вещество, напоминающее меланин. Известно, что меланизация у артропод

является важнейшим защитным механизмом, приводящим к формированию и скоплению меланина на поверхности патогенных организмов. В процессе меланогенеза образуется ряд токсичных соединений, которые в ряде случаев негативно влияют на жизнедеятельность паразитов/паразитоидов [10, 11]. Среди беспозвоночных животных наиболее полно механизмы защиты от различных патогенных организмов изучены у насекомых. Так, в гемоцеле комаров *A. quadrimaculatus* на поверхности микрофилярий нематод *B. pahangi* и *B. malayi* сначала откладывается слой меланина, а затем поверх него начинают оседать гемоциты, образующие несколько слоев [12]. Некоторые из этих нематод имеют признаки деструкции. Аналогичная опосредованная клетками реакция меланизации и последующая инкапсуляция описаны вокруг дегенерированных яиц ос *Asobara tabida* и *Asobara citri* в представителях нескольких видов дрозophil [13], а также вокруг личинок ос *Leptopilina heterotoma*, погибших в *Drosophila suzukii* [14]. Среди ракообразных, в частности, амфипод, меланизированными находили личинок разных видов скребней и трематод [15–17]. Так, в амфиподах *Spinulogammarus ochotensis* цистаканты скребней *Corynosoma strumosum* окружены сплошным ободком темно-коричневого вещества, предположительно меланина, плотно прилегающего к поверхности паразита, при этом личинки в окружении меланотической капсулы были погибшими [17]. В случае меланизации метацеркарий трематод пигмент нередко откладывается на поверхность цисты, которая синтезируется тегументом паразита. К примеру, в амфиподах *Gammarus insensibilis* обнаружено четыре вида микрофаллидных трематод, различающихся разной интенсивностью меланизации, при этом наибольшей пигментации подвержен тот вид, который, по предположению авторов, либо слабо адаптирован к хозяину, либо является наиболее патогенным для последнего [16]. Однако в работе нет указаний о жизнеспособности этих трематод. У исследованных нами подокотилей слой предполагаемого пигмента располагался не на поверхности паразита или окружающей его цисты, а на поверхности внутреннего слоя капсулы, то есть в сущности представлял собой наружный слой капсулы.

Согласно литературным сведениям, полностью меланизированные паразиты погибают не во всех случаях, иными словами, меланизация не всегда приводит к их гибели [18]. Более того, часто находят погибших паразитов без признаков меланизации [19] или пигмент может откладываться позже и на поверхности уже погибших паразитов [20, 21], то есть пигментации подвергается уже погибшая ткань. В последнем случае, в качестве примера, можно привести работу Дэдхад с соавт. [22], в которой в экспериментальных условиях

было показано, что в гемоцеле *Anopheles paraliae* дегенерированные нематоды *B. malayi* обнаруживаются через 3 ч после заражения комаров, а у *Anopheles lesteri* — через 4 ч. Меланизированные особи этих червей у обоих видов комаров наблюдались спустя 1 ч, то есть через 4 и 5 ч после заражения соответственно. Как было показано выше, у исследованных подокотилей внутренний слой капсулы образован разрушенной тканью. Таким образом, можно предполагать, что отложение пигмента на поверхности капсулы подокотилей определенным образом связано с гибелью и дегенерацией материала ее внутреннего слоя.

Морфология цисты. Строение цисты у подокотилей из обоих исследованных видов амфипод также оказалось сходным. На свето-микроскопическом уровне циста во всех случаях характеризуется относительно постоянной толщиной (около 8–10 мкм) и интенсивно окрашивается гистологическими красителями (рис. 2). На большем увеличении она представляет собой единый слой однородного, аморфного материала (рис. 1Д). Окружающая капсула иногда плотно прилегает к цисте, но чаще их разделяет «свободное» пространство.

Структура и процесс формирования цисты метацеркарий изучены у большого количества видов трематод, инвазирующих в качестве второго промежуточного хозяина как позвоночных [23],

так и беспозвоночных животных [24, 25]. В зависимости от систематической принадлежности трематод и их хозяев цисты метацеркарий различаются количеством слоев: последние могут варьировать по строению, толщине, химическому составу. У рассматриваемых *P. atomon*, как и у *P. reflexa*, исследованных на гистологическом уровне [5], циста представлена в виде единого, образованного однородным веществом, слоя.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что капсула, окружающая исследованных метацеркарий подокотилей, состоит из двух слоев. При этом наружный слой предположительно пигментирован, тогда как внутренний образован дегенерированной тканью хозяина (возможно, мышечной). Циста исследованных метацеркарий по своему строению не отличается от таковой, описанной у *P. reflexa*. Для уточнения структуры внутреннего слоя капсулы, а также проверки предположения о меланизации наружного слоя капсулы необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Таксономическое, морфологическое и экологическое разнообразие гельминтов позвоночных животных Северной Азии» № ААА-А17-117012710031-6. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орловская О.М. Новые сведения о жизненных циклах некоторых видов трематод прибрежных рыб Северного Охотоморья // Биоразнообразие и экология паразитов. Труды Центра паразитологии. Том XLVI / Под ред. С.В. Зиновьева. М.: Наука, 2010. С. 186–197.
2. Успенская А.В. Паразитофауна бентических ракообразных Баренцева моря. М.: Изд-во акад. наук СССР, 1963. 126 с.
3. James B.L. Host selection and ecology of marine digenean larvae // Fourth European marine biology symposium / Ed. D.J. Crisp. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1971. P. 179–197.
4. Koie M. On the morphology and life history of *Podocotyle reflexa* and a comparison of its developmental stages with those of *P. atomon* (Trematoda, Opencolidae) // Ophelia. 1980. Vol. 20. N 1. P. 17–43.
5. Shimazu T. On two metacercariae on the genus *Podocotyle* from the shrimp, *Pandalus goniurus*, from Aniwa Bay, Sakhalin, USSR (Trematoda, Opencolidae) // Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 1973. Vol. 39. N 5. P. 481–487.
6. Lo S.J., Hall J.E., Allender P.A., Klainer A.S. Scanning electron microscopy of an opencolid cercaria and its encystment and encapsulation in an insect host // J. Parasitol. 1975. Vol. 61. N 3. P. 413–417.
7. Knowles E.E., Hall J.E. Histopathology of an opencolid trematode infection in mayfly Naiads // J. Invert. Pathol. 1976. Vol. 27. N 3. P. 351–362.
8. Beckett E.B. Histological changes in mosquito flight muscle fibres associated with parasitization by filarial larvae // Parasitology. 1971. Vol. 63. N 3. P. 365–372.
9. Chikilian M.L., Bradley T.J., Nayar J.K., Knight J.W. Ultrastructural comparison of extracellular and intracellular encapsulation of *Brugia malayi* in *Anopheles quadrimaculatus* // J. Parasitol. 1994. Vol. 80. N 1. P. 133–140.
10. Глухов В.В., Слепнева И.А., Дубовский И.М. Генерация активированных кислородных метаболитов при формировании иммунного ответа у членистоногих // Труды Зоол. ин-та. РАН. 2009. Т. 313. № 3. С. 297–307.
11. Dubovskiy I.M., Kryukova N.A., Glupov V.V., Ratcliffe N.A. Encapsulation and nodulation in insects // Invert. Surv. J. 2016. Vol. 13. N 1. P. 229–246.
12. Chen C.C. Further evidence of both humoral and cellular encapsulations of sheathed microfilariae of *Brugia pahangi* in *Anopheles quadrimaculatus* // Parasitology. 1988. Vol. 78. N 6. P. 819–826.
13. Nappi A., Poirié M., Carton Y. The role of melanization and cytotoxic by products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps // Adv. Parasitol. 2009. Vol. 70. N 4. P. 99–121.
14. Kim-Jo C., Gatti J-L., Poirié M. *Drosophila* cellular immunity against parasitoid wasps: a complex and time-dependent process // Frontiers Physiol. 2019. Vol. 10: 603.
15. Dezfili B.S., Simoni E., Duclos L., Rossetti E. Crustacean-acanthocephalan interaction and host cell-mediated immunity: parasite encapsulation and melanization // Folia Parasitol. 2008. Vol. 55. N 1. P. 53–59.
16. Kostadinova A., Mavrodiya R.S. Microphallids in *Gammarus insensibilis* Stock, 1966 from a Black Sea Lagoon:

host response to infection // *Parasitology*. 2005. Vol. 131. N 3. P. 347–354.

17. Skorobrekhova E.M., Nikishin V.P. Encapsulation of the acanthocephalan *Corynosoma strumosum* (Rudolphi, 1802) Lühe, 1904, in the intermediate host *Spinulogammarus ochotensis* // *J. Parasitol.* 2019. Vol. 105. N 4. P. 567–570.

18. Christensen B.M., Li J., Chen C.-C., Nappi A.J. Melanization immune responses in mosquito vectors // *Trends Parasitol.* 2005. Vol. 21. N 4. P. 192–199.

19. Carton Y., Frey F., Nappi A.J. Inheritance of cellular immune resistance in *Drosophila melanogaster* // *Heredity*. 1992. Vol. 69. P. 393–399.

20. Salt G. The cellular defense reactions of insects. Cambridge monograph in experimental biology. London: Cambridge Univ. Press, 1970. 118 pp.

21. Kobayashi M., Ogura N., Yamamoto H. Studies on filariasis VIII: histological observation on the abortive development of *Brugia malayi* larvae in the thoracic muscles of the mosquitoes, *Armigeres subalbatus* // *Jpn. J. Sanit. Zool.* 1986. Vol. 37. N 2. P. 127–132.

22. Dedkhad W., Christensen B.M., Bartholomay L.C., Joshi D., Hempelchom C., Saeung A. Immune responses of

Aedes togoi, *Anopheles paraliae* and *Anopheles lesteri* against nocturnally subperiodic *Brugia malayi* microfilariae during migration from the midgut to the site of development // *Parasites Vectors*. 2018. Vol. 11: 528.

23. Martin T.R., Conn D.B. The pathogenicity, localization, and cyst structure of echinostomatid metacercariae (Trematoda) infecting the kidneys of the frogs *Rana clamitans* and *Rana pipiens* // *J. Parasitol.* 1990. Vol. 76. N 3. P. 414–419.

24. Taft S.J. Cinephotomicrographic and histochemical observations on cercarial penetration and encystment by *Plagiorchis* sp. in larvae of *Chaoborus* sp. // *Trans. Am. Micros. Soc.* 1990. Vol. 109. N 2. P. 160–167.

25. Galaktionov K.V., Malkova I.I., Irwin S.W.B., Saville D.H., Maguire J.G. The structure and formation of metacercarial cysts in the trematode family Microphallidae Travassos 1920 // *J. Helminthol.* 1997. Vol. 71. N 1. P. 13–20.

Поступила в редакцию 07.06.2020 г.

После доработки 28.09.2020 г.

Принята в печать 07.10.2020 г.

SHORT COMMUNICATION

Structure of the envelopes that are formed around metacercariae of the trematode *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) in its second intermediate host

E.M. Skorobrekhova 

Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Portovaya str., 18, Magadan, 685000, Russia

We assessed the structure of *Podocotyle atomon* metacercariae cysts and their surrounding capsules in the trematode's second intermediate hosts – *Locustogammarus locustoides* (Brandt, 1851) and *Spinulogammarus ochotensis* (Brandt, 1851) – using light and transmission electron microscopy. The cysts, which are synthesized from materials secreted by the parasite tegument, exhibited a single, amorphous layer. The capsules formed by the host consisted of two layers: an electron-light, loose inner layer and an electron-dark, unstructured outer layer, which incorporated a small amount of intact and fragmented host cells. The inner capsule layer may have been formed by degeneration and transformation of the amphipod's muscle tissue that surrounds the larva. The outer layer of the capsule appeared to contain pigment deposits.

Keywords: ultrastructure, amphipods, metacercariae, cyst, capsule, *Podocotyle atomon*

Сведения об авторе

Скоробрехова Екатерина Михайловна – науч. сотр. лаборатории экологии гельминтов Института биологических проблем Севера ДВО РАН. Тел.: 8-4132-634-463 e-mail: skorobrekhova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9497-584X>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 576.36:57.016

Функциональная активность арил-гидрокарбонового рецептора в первичных культурах клеток остеогенной саркомы человека**Ю.Е. Воронцова*** , **А.А. Акишина** , **Р.О. Черезов** , **О.Б. Симонова** *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, РАН, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26***e-mail: vorontsova@idbras.ru*

Остеогенная саркома — агрессивная злокачественная опухоль костной ткани, возникающая в молодом возрасте (10–19 лет) и, как правило, заканчивающаяся фатально. Арил-гидрокарбоновый рецептор человека (Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR) — лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который связан с детоксикацией ксенобиотиков и канцерогенезом. Известно, что некоторые лиганды AHR входят в состав фармацевтических препаратов, применяемых в онкотерапии. Однако в мировой литературе мало работ, посвященных исследованию последствий их воздействия на клетки остеосаркомы. В данной работе были получены три первичные культуры из биопсийного материала злокачественных опухолей костной ткани остеогенной саркомы человека. Во всех культурах остеосарком было отмечено повышенное содержание белка AHR по сравнению с линиями клеток неопухолового происхождения. Функциональную активность AHR в клетках остеосарком оценивали по специфичности активации его генов-мишеней после применения известных экзогенных лигандов: индирубина и индол-3-карбинола. В качестве генов-мишеней AHR анализировали гены одного семейства цитохромов: *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*. Было показано, что во всех полученных культурах AHR функционально активен, однако профиль активации экспрессии его генов-мишеней в ответ на действие лиганда варьировал.

Ключевые слова: арил-гидрокарбоновый рецептор AHR, цитохромы P450 семейства CYP1, остеосаркома, индирубин, индол-3-карбинол, первичные культуры

Остеогенная саркома, или остеосаркома — первичная злокачественная опухоль, происходящая из костной ткани. Является наиболее распространенным злокачественным процессом в костях. Эти опухоли характеризуются быстрым прогрессирующим ростом, ранним метастазированием, частым возникновением рецидивов после оперативного лечения и заканчиваются, как правило, фатально. Остеосаркома чаще наблюдается у молодых пациентов, пик заболеваемости приходится на период быстрого роста: 10–14 лет у девочек и 15–19 лет у мальчиков [1]. Несмотря на большое количество проведенных исследований, направленных на оптимизацию режимов системной терапии сарком [2–4], эффективность терапии этих злокачественных новообразований остается низкой. Накопленные данные свидетельствуют о необходимости изучения факторов, влияющих на прогноз заболевания и результатов химиотерапии, а также поиска альтернативных методов лечения остеосарком.

Арил-гидрокарбоновый рецептор (Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR) — лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который связан с детоксикацией ксенобиотиков и канцерогенезом. На данный момент известно большое количество соединений, которые могут выступать в качестве лиганда для AHR, среди них пищевые вещества,

природные и синтетические флавоноиды, а также фармацевтические препараты, в том числе применяемые в онкотерапии [5–7].

В неактивном состоянии AHR существует в цитоплазме в мультипептидном комплексе с димером белка теплового шока HSP90 (Heat Shock Protein 90), кошапероном p23 и белком AIP (AHR Interacting Protein). После связывания лиганда с AHR комплекс диссоциирует и AHR перемещается в ядро, где связывается с ядерным переносчиком AHR — ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) [8]. Образованный гетеродимер AHR:ARNT взаимодействует с регуляторными элементами *XRE* (Xenobiotic Response Element) генов-мишеней, что приводит к инициации их транскрипции [9–11].

Наиболее изученными мишенями AHR являются гены, кодирующие ферменты метаболизма ксенобиотиков, а именно — ферменты системы цитохрома P450 (cytochrome P450, CYP). В настоящее время известно, что во многих опухолевых клетках изменения соотношения различных изоформ CYP и их индуцибельности отличаются от таких изменений в неопухолевых клетках, и это может сильно влиять на эффективность лечения противоопухолевыми препаратами.

В настоящее время AHR рассматривают в качестве потенциальной мишени для противорако-

вой терапии [5–7, 12, 13]. Несмотря на множество работ, посвященных изучению активности АНР при разных типах онкологических заболеваний, среди них мало исследований, касающихся его роли в злокачественных новообразованиях костей, в частности, при остеогенных саркомах [14, 15].

Целью нашей работы стало исследование функциональной активности АНР в первичных культурах клеток остеогенных сарком человека после воздействия на них его экзогенных лигандов.

Материалы и методы

Получение первичных культур клеток остеогенной саркомы. Образцы опухолевой ткани были получены в 2018 г. из биопсийного материала больных с диагнозом «конвенциональная остеогенная саркома, остеобластический вариант». Пациенты мужского и женского пола в возрасте 14–16 лет, химиотерапевтическое лечение до взятия биопсийного материала не проводилось. Опухолевые образцы транспортировали в лабораторию в течение 2–3 ч в бессывороточной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ПанЭко, Россия) с добавлением 100 мкг/мл гентамицина (Микроген, Россия). Далее полученную ткань обрабатывали механически и ферментативно (раствор трипсина-ЭДТА 0,25%, ПанЭко, Россия) до получения клеточной суспензии, которую переносили во флаконы (Corning Costar, США) со средой DMEM/F12 (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия) и гентамицина (50 мкг/мл).

Клеточные линии и условия культивирования. Линии клеток эмбриональной почки человека HEK293 и мезенхимальных стволовых клеток MSC культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия) и гентамицина в концентрации 50 мкг/мл.

Обработка клеток лигандами. Первичные культуры клеток остеосаркомы рассеивали на 6-луночные чашки и через сутки в клеточную среду добавляли лиганды с конечной концентрацией 100 нМ для индирубина (Sigma-Aldrich, США), 100 мкМ для индол-3-карбинола (Mirax Biopharma, Россия). Стоковые растворы лигандов были приготовлены с использованием ДМСО (диметилсульфоксид; ПанЭко, Россия). Соответствующее количество ДМСО было добавлено к контрольному образцу клеток. Клетки инкубировали с лигандами в течение 24 ч.

Выделение РНК, ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли с помощью RNeasy Lysis Reagent (Sigma-Aldrich, США) по протоколу производителя. Качество выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0,01% бромистого

этидия. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT Kit (Евроген, Россия), ПЦР в реальном времени — с помощью набора реактивов qPCRMix-HS SYBR+HighRox (Евроген, Россия). Реакцию ставили в амплификаторе ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, США). Условия амплификации: 95° — 5 мин, затем 40 циклов (95° — 15 с, 60° — 15 с, 72° — 30 с). В качестве референсных генов использовали *GAPDH* и *HPRT1*. Уровень экспрессии генов оценивали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. В работе использовали следующие последовательности пар праймеров: для гена *GAPDH*: прямой — TGCACCACCAACTGCTTAGC, обратный — GGCATGGACTGTGGTCATGAG; для гена *HPRT1*: прямой — TGAGGATTTGGAAAGGGTGT, обратный — GAGCACACAGAGGGCTACAA; для гена *CYP11A1*: прямой — GATTGAGCACTGTCAGGAGAAGC, обратный — CCAAAGAGGTCCAAGACGATGTTA; для гена *CYP11A2*: прямой — ATCCTGGAGACCTTCCGACACT, обратный — GATGTAGAAGCCATTACGCGTTGTG; для гена *CYP11B*: прямой — CTCAACCGCAACTTCAGCAACTTC, обратный — AGAGAGGATAAAGGCGTCCATCAT. Для каждого образца было сделано три повтора. Статистическую значимость различий между образцами оценивали с помощью программного обеспечения REST (Qiagen, США) [16]. Значение $p < 0,05$ считали значимым.

Вестерн-блоттинг. Общий клеточный белок выделяли в буфере по Лэммли (10% SDS, 50 мМ Tris-HCl pH 6,8, 25% глицерина, 0,05% бромфенолового синего и 6% 2-меркаптоэтанола). Белковый экстракт разделяли с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле в камере Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом производителя, белки переносили на мембрану Hybond ECL (Sigma Aldrich, США). Мембрану инкубировали в буфере TBS-T (10 мМ Tris-HCl pH 7,4, 150 мМ NaCl и 0,1% Tween 20), содержащем 2% BSA, в течение 1 ч, а затем инкубировали с первичными антителами при 4°С в течение ночи (против АНР — D5S6H, Cell Signaling Technology, США, 1:7000; против *GAPDH* — ab9385, Abcam, Великобритания, 1:10000). После этого мембрану отмывали в буфере TBS-T 3 раза по 20 мин и инкубировали со вторичными антителами (C1313, Santa Cruz, США, 1:12000) в течение 2 ч при комнатной температуре. Иммунокомплексы выявляли с помощью набора реактивов ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Sigma Aldrich, США).

Результаты и обсуждение

Были получены три первичные культуры из биопсийного материала злокачественных опухо-

лей костной ткани остеогенной саркомы человека (O.src 25/16, O.src 17/18, O.src 20/18). Во всех культурах остеосаркомы было обнаружено повышенное содержание белка АНР по сравнению с неопухолевыми клетками HEK293 и MSC (рис. 1).

Также мы сравнили исходный уровень экспрессии генов *CYP* в культурах клеток остеосаркомы без активации АНР лигандами. Самый высокий уровень экспрессии гена *CYP1A1* наблюдался в культуре O.src20/18, гена *CYP1A2* — в O.src17/18, а гена *CYP1B* — в культуре O.src25/16 (рис. 2).

Функциональная активность АНР оценивалась по изменению экспрессии генов семейства 1 цитохрома Р450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) после воздействия на клетки его известных экзогенных лигандов — индирубина и индол-3-карбинола.

При сравнении уровня экспрессии генов-мишеней арил-гидрокарбонового рецептора (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) в полученных культурах остеогенных сарком были выявлены различия в интенсивности активации генов-мишеней разными лигандами. В культуре O.src17/18 уровень экспрессии *CYP1A1* повышался в 7 раз при добавлении индирубина, но при добавлении индол-3-карбинола — только в 2 раза, при этом уровень

экспрессии других генов, *CYP1A2* и *CYP1B*, практически не менялся (рис. 3А). В клеточной культуре остеосаркомы O.src 20/18 было выявлено, что при добавлении индол-3-карбинола уровни экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B* повышаются в 2 и в 3 раза соответственно, но не меняются при добавлении индирубина, а уровень экспрессии гена *CYP1A2* снижается после добавления лигандов (рис. 3Б). При анализе экспрессии генов-мишеней в культуре O.src25/16 после добавления лигандов уровень экспрессии гена *CYP1A1* повышался в 32 и 49 раз, уровень гена *CYP1A2* увеличивался в 12 и 15 раз, при этом экспрессия гена *CYP1B* под воздействием лигандов повышалась не более чем в 3 раза (рис. 3В).

В таблице (рис. 3Г) приведены суммарные результаты по анализу изменения уровня экспрессии генов-мишеней АНР после воздействия лигандов на первичные культуры клеток остеогенной саркомы.

В наших сравнительных экспериментах мы обнаружили, что в большинстве случаев АНР функционально активен как лиганд-зависимый транскрипционный фактор генов-мишеней семейства *CYP* в первичных культурах клеток остео-

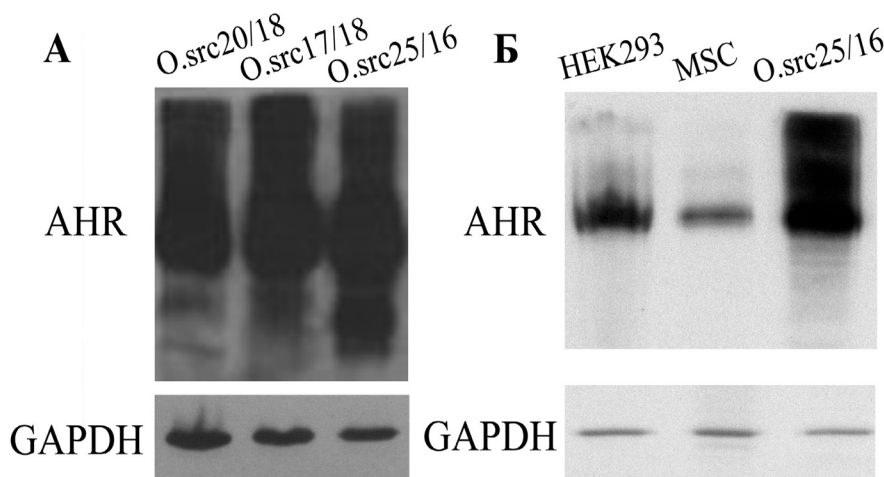


Рис. 1. Иммуноблот-анализ белка АНР в полученных нами клеточных культурах остеогенных сарком O.src20/18, O.src17/18, O.src25/16 (А) и в клеточных линиях неопухолевого (HEK293, MSC) происхождения (Б). Белок GAPDH использовался как референсный.

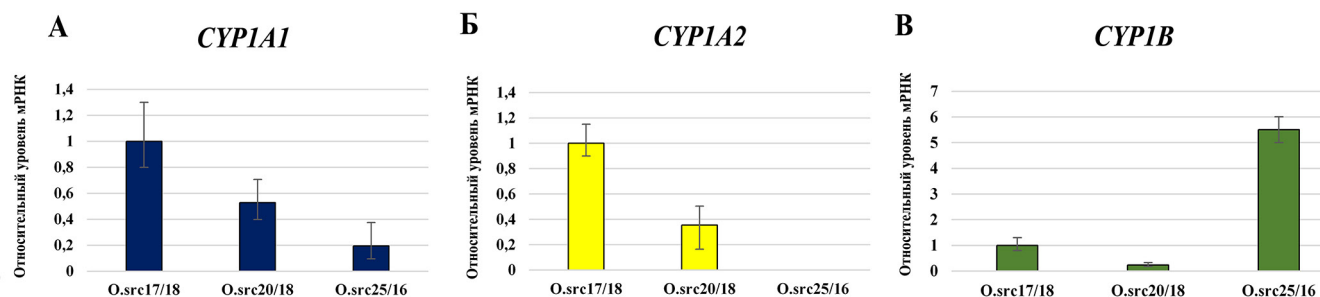


Рис. 2. Уровень экспрессии генов *CYP* в клеточных культурах остеосарком без активации АНР лигандами: А–В: Уровень экспрессии выровнен относительно клеточной линии O.src17/18. На оси ординат представлено значение $R = 2\Delta C_t$, т.е. отношение количества мРНК целевого гена к количеству мРНК генов домашнего хозяйства *GAPDH* и *HPRT1*.

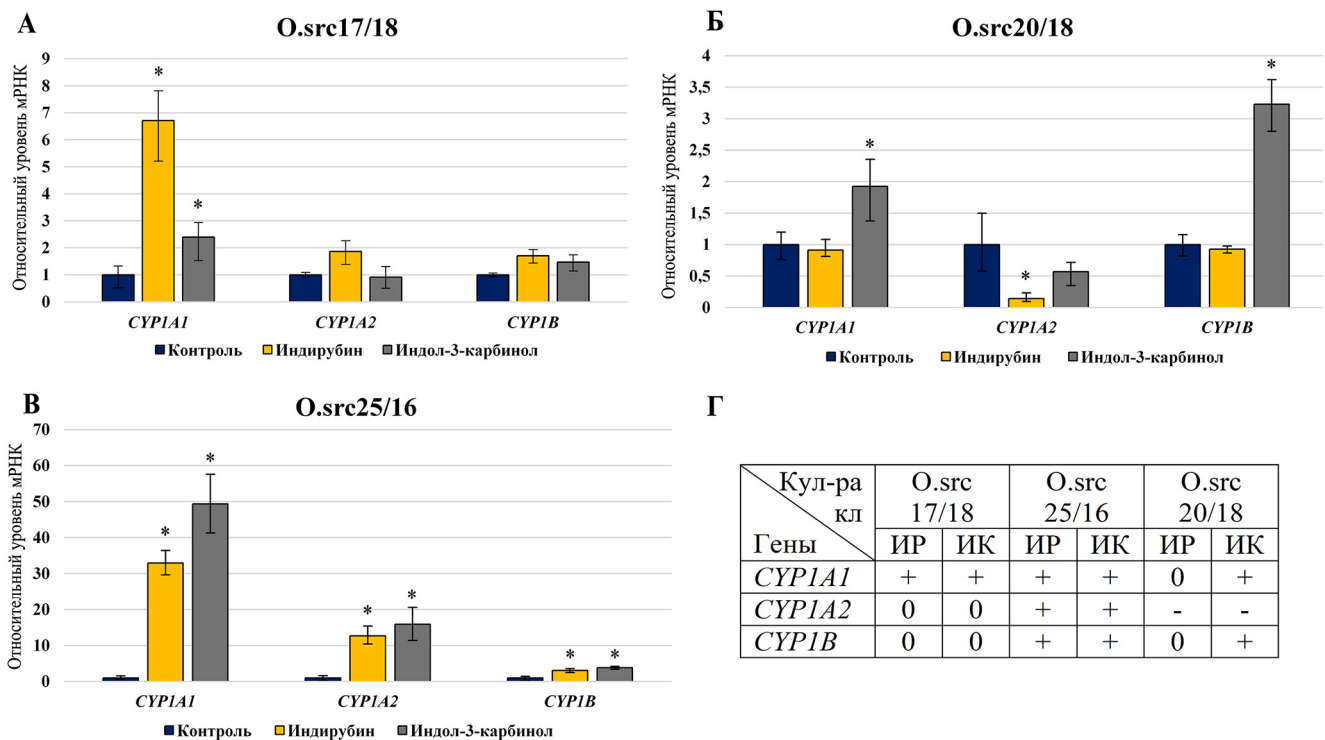


Рис. 3. Уровень экспрессии генов-мишеней АНР (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) в первичных клеточных культурах остеосарком до (контроль) и после добавления лигандов (индирубин, индол-3-карбинол). **А** – O.src20/18, **Б** – O.src17/18, **В** – O.src26/16. На оси ординат представлено значение $R = 2\Delta Ct$, т.е. отношение количества мРНК целевого гена к количеству мРНК генов домашнего хозяйства *GAPDH* и *HPRT1*. Звездочка указывает на значимое различие в экспрессии генов по сравнению с контролем ($p < 0,05$). **Г** – Направленность изменения относительного уровня экспрессии генов *CYP* после добавления лигандов. Условные обозначения: «+» – уровень транскрипции повышался, «-» – уровень транскрипции понижался, «0» – уровень транскрипции не менялся (все – относительно контрольной группы). ИР – индирубин, ИК – индол-3-карбинол. Кул-ра кл. – культура клеток остеогенной саркомы.

саркомы. Интересно, что гены-мишени одного семейства цитохромов Р450, участвующие в процессах метаболизма, по-разному реагировали на воздействие лиганда в пределах одной культуры клеток. Также была различна интенсивность активации одного и того же гена разными лигандами. Возможно, последствия активации АНР в культурах остеогенных сарком зависят от дополнительных факторов, например, от эпигенетического статуса его целевых генов и наличия неизвестных эндогенных лигандов, что требует дальнейшего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amankwah E.K., Conley A.P., Reed D.R. Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma // Clin. Epidemiol. 2013. Vol. 5. P. 147–162.
2. Ritter J., Bielack S.S. Osteosarcoma // Ann. Oncol. 2010. Vol. 21. Suppl. 7. P. 320–325.
3. Hattinger C.M., Serra M. Role of pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes in treating osteosarcoma // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2015. Vol. 11. N 9. P. 1449–1463.
4. Byrgazov K., Anderson C., Salzner B., Bozsaky E., Larsson R., Gullbo J., Lehner M., Lehmann F., Slipicevic A., Kager L., Fryknäs M., Taschner-Mandl S. Targeting aggressive osteosarcoma with a peptidase-enhanced cytotoxic melphalan flufenamide // Ther. Adv. Med. Oncol. 2020. Vol. 12: e1758835920937891.

Авторы выражают благодарность Пантелееву Дмитрию Юрьевичу, сотруднику Института биологии гена РАН, за помощь в проведении экспериментов. Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0001. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с человеческим материалом, установленными этической комиссией Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

5. Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B. Aryl-hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy // Biochem. (Mosc.), Suppl., Ser. B Biomed. Chem. 2019. Vol. 13. N 1. P. 36–54.
6. Feng S., Cao Z., Wang X. Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1836. N 2. P. 197–210.
7. Safe S., Jayaraman A., Chapkin R.S. Ah receptor ligands and their impacts on gut resilience: structure-activity effects // Crit. Rev. Toxicol. 2020. Vol. 50. N 6. P. 463–473.
8. Pollenz R.S., Barbour E.R. Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation // Mol. Cell Biol. 2000. Vol. 20. N 16. P. 6095–6104.

9. Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis // *Biochem. Pharmacol.* 2000. Vol. 59. N 1. P. 65–85.
10. Beischlag T.V., Luis Morales J., Hollingshead B.D., Perdew G.H. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2008. Vol. 18. N 3. P. 207–250.
11. Pollenz R.S. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation // *Chem. Biol. Interact.* 2002. Vol. 141. N 1–2. P. 41–61.
12. Narasimhan S., Stanford Zulick E., Novikov O., Parks A.J., Schlezinger J.J., Wang Z., Laroche F., Feng H., Mulas F., Monti S., Sherr D.H. Towards resolving the pro- and anti-tumor effects of the aryl hydrocarbon receptor // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. N 5. e1388.
13. Murray I.A., Morales J.L., Flaveny C.A., Dinatale B.C., Chiaro C., Gowdahalli K., Amin S., Perdew G.H. Evidence for ligand-mediated selective modulation of aryl hydrocarbon receptor activity // *Mol. Pharmacol.* 2010. Vol. 77. N 2. P. 247–254.
14. Miki Y., Hata S., Ono K., Suzuki T., Ito K., Kumamoto H., Sasano H. Roles of aryl hydrocarbon receptor in aromatase-dependent cell proliferation in human osteoblasts // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 10: 2159.
15. Montazeri-Najafabady N., Dabbaghmanesh M.H., Chatrabnous N., Arabnezhad M.R. The effects of astaxanthin on proliferation and differentiation of MG-63 osteosarcoma cells via aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway: A comparison with AhR endogenous ligand // *Nutr. Cancer.* 2019. Vol. 72. N 8. P. 1400–1410.
16. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30. N 9: e36.

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.

После доработки 27.09.2020 г.

Принята в печать 09.10.2020 г.

SHORT COMMUNICATION

Functional activity of aryl hydrocarbon receptor in human osteosarcoma cell cultures

Yu.E. Vorontsova* , A.A. Akishina , R.O. Cherezov , O.B. Simonova 

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Russia, 119334, Moscow, Vavilov Street, 26.
*e-mail: vorontsova@idbras.ru

Osteosarcoma is the most prevalent bone malignant tumor with a high mortality rate among children and adolescents. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-dependent transcription factor associated with xenobiotic detoxification and carcinogenesis. It is known that some AHR ligands are included in the composition of drugs used in cancer therapy. However there are few works devoted to the study of their effect on osteosarcoma cells. In this work, three primary cell cultures were obtained from biopsy material of malignant bone tumors of human osteosarcoma. AHR protein levels were high in all primary osteosarcoma cell cultures. The functional activity of AHR in osteosarcoma cells was estimated by induction of its target genes by known exogenous ligands: indirubin and indole-3-carbinol. The genes of Cytochrome P450 1 family were analyzed as AHR target genes: *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*. It was shown that the aryl-hydrocarbon receptor is functionally active in all cultures, but the target genes were induced differently by ligand treatment within the same cell culture.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor AHR, cytochrome P450 family CYP1, osteosarcoma, indirubin, indol-3-carbinol, cell culture

Сведения об авторах

Воронцова Юлия Евгеньевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: vorontsova@idbras.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3378-1515>

Акишина Ангелина Александровна — мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: ilitiri@bk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3428-7287>

Черезов Роман Олегович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: ro-tcherezov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3955-9771>

Симонова Ольга Борисовна — докт. биол. наук, зав. лабораторией молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: osimonova@hotmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9439-524X>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.323

Определение константы связывания фрагмента белка LANA с нуклеосомой

Р.В. Новиков^{1,2,†}, Е.А. Бондаренко^{1,†} , Н.В. Малюченко¹, А.В. Феофанов^{1,3},
В.М. Студитский^{1,4}, А.К. Шайтан^{1,2,*} 

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

²Научно-технологический университет «Сириус», Россия, 354340, г. Сочи, ул. Олимпийская, д. 1;

³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

⁴Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

*e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru

†равноценный вклад

На поверхности нуклеосомы существует множество сайтов для взаимодействия с белками хроматина, среди которых выделяется кислотный лоскут — отрицательно заряженный участок, образованный боковыми цепями аминокислот гистонов димера H2A/H2B. Кислотный лоскут рассматривается как мишень для противораковых лекарств, а также является местом воздействия некоторых патогенов. Так, было показано, что этот регион является местом связывания белка LANA герпесвируса человека 8 типа и выполняет связующую роль между эписомами вируса и митотическими хромосомами. Развитие методов анализа взаимодействий различных соединений с нуклеосомой необходимо как для понимания механизмов регуляции хроматина, так и для дизайна лекарственных агентов. В настоящей работе предложена методика и проведены измерения константы связывания фрагмента белка LANA с нуклеосомой. В отличие от предыдущих работ измерения проведены при физиологической концентрации соли в буферном растворе. Предложенная методика основана на детекции сигнала флуоресцентно-меченых пептидов после разделения комплексов нуклеосом с пептидами методом гель-электрофореза. В работе также обсуждаются математические модели для анализа взаимодействия между пептидами и нуклеосомой, а также возможные факторы, способные влиять на него.

Ключевые слова: нуклеосома, LANA, константа связывания, гель-электрофорез, кислотный лоскут, уравнение Хилла

У эукариотических организмов геном организован в виде хроматина, наименьшей структурной единицей которого является нуклеосома. Это повторяющийся элемент хроматина, состоящий из сегмента ДНК длиной около 200 пар нуклеотидов, центральная область (длиной 146–147 п.н.) которого закручена в левую суперспираль вокруг белкового октамера, состоящего из гистонов H3, H4, H2A, H2B. На поверхности нуклеосомы существует множество областей, через которые осуществляются взаимодействия нуклеосом с белками хроматина, которые в свою очередь обеспечивают тонкую и сложную регуляцию функционирования хроматина посредством изменения динамических свойств нуклеосомы [1, 2]. Среди всех областей выделяется кислотный лоскут — участок на поверхности гистонов димера H2A/H2B, который, в отличие от остальной

поверхности нуклеосомы, несет отрицательный заряд [3]. По результатам исследований было показано, что не только белки хроматина взаимодействуют с этим участком, но и некоторые вирусы способны использовать эти взаимодействия для позиционирования генетического материала на поверхности нуклеосомы. Одним из таких вирусов является герпесвирус человека 8 типа, играющий этиологическую роль при саркоме Капоши (KSHV). Прикрепление эписом вируса KSHV к митотическим хромосомам инфицированных клеток происходит благодаря взаимодействию белка LANA (latency associated nuclear antigen) с кислотным лоскутом, а именно — N-концевой последовательности белка длиной 22 аминокислотных остатка (пептида LANA) [4]. Также область кислотного лоскута представляет собой мишень для терапевтических агентов противора-

ковой терапии и нуклеосом-связывающих патогенов [5]. В связи с этим, важно изучать взаимодействия кислотного лоскута с различными соединениями, в том числе и с пептидами, а также необходимо оптимизировать методы анализа этих взаимодействий. Важность такой оптимизации подчеркивается тем, что в разных работах измеренная константа диссоциации комплексов пептида LANA с нуклеосомой значительно различается: 200 нМ по данным спектрофотометрического анализа [6], и 8 мкМ — по данным метода гель-электрофореза [7]. Таким образом, константа диссоциации комплекса пептида LANA с нуклеосомой остается недостаточно охарактеризованной. В данной статье мы уточнили эту константу, апробировав способ анализа взаимодействия пептидов с нуклеосомой, основанный на методе гель-электрофореза с применением флуоресцентно-меченных пептидов, при физиологической концентрации ионов в растворе. Кроме того, обсуждаются математические принципы анализа взаимодействия между пептидом LANA и нуклеосомой, а также возможные факторы, которые могут на него влиять.

Материалы и методы

Приготовление моноклеосом и пептида LANA. Были получены моноклеосомы, реконструированные по ранее опубликованной методике [8] с использованием ДНК-матрицы, имеющей нуклеосом-позиционирующую последовательность s603 (147 п.н.) [9], и октамера рекомбинантных гистонов из *Xenopus laevis*. Используемая ДНК-матрица на 5'-конце содержала флуорофор FAM. Пептид LANA, меченный флуорофором циановым 5 (Cy5) по N-концу, был синтезирован компанией GenScript (США).

Обработка пробирок. Для снижения адгезии пептида LANA на стенках пробирок проводилась предварительная обработка пробирок буфером, содержащим Tris-HCl (20 мМ), KCl (150 мМ), 2-меркаптоэтанол (1 мМ), 0,1% БСА и раствор пептида в концентрации в 10 раз меньшей, чем концентрация пептида, используемая для анализа его связывания с нуклеосомой (см. следующий пункт). Предварительная инкубация производилась в течение 10 мин, затем раствор отбирался полностью.

Приготовление комплекса пептида LANA с нуклеосомой и его анализ. Пептид LANA в возрастающей концентрации (2–20 мкМ с шагом 2 мкМ) инкубировали с 57 нМ моноклеосом в реакционном буфере (Tris-HCl 20 мМ, KCl 150 мМ, 2-меркаптоэтанол 1 мМ) в течение 2 ч. Для отделения комплексов с нуклеосомами от свободного пептида и иных примесей использовали метод гель-электрофореза в 6%-ном нативном полиакриламидном геле при 140 В в течение

40–50 мин. Получаемый гель анализировали на приборе PharosFXTM Plus Molecular Imager (BioRad, США).

Обработка данных. Для определения константы диссоциации флуоресценцию в геле возбуждали светом длиной волны 635 нМ и регистрировали при длине волны 695 нМ, а для визуализации нуклеосом, меченных флуорофором FAM, флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 488 нМ и регистрировали при длине волны 530 нМ. Денситометрию обнаруженных в геле полос выполняли с использованием программы ImageJ (NIH, США) [10]. Нормировку и обработку данных проводили с помощью программных кодов, написанных на языке Python с использованием пакета SciPy [11]. Аппроксимацию экспериментальных данных выполняли с использованием уравнения Хилла:

$$\theta = \frac{[P]^n}{[P]^n + K_d^n}, \quad (1)$$

где θ — средняя доля сайтов связывания на поверхности нуклеосом, занятая пептидом; $[P]$ — концентрация пептида; K_d — микроскопическая константа диссоциации — концентрация пептида, при которой половина сайтов связывания занята пептидом (у нуклеосомы два сайта связывания пептида); n — коэффициент Хилла. Также использовалась модификация уравнения Хилла с учетом количества пептида, расходующегося на неспецифические взаимодействия:

$$\theta = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_d}{[P - P_0]} \right)^n}, \quad (2)$$

где P_0 — количество адсорбирующегося пептида.

Результаты и обсуждение

Для измерения константы связывания нами был выбран метод, заключающийся в инкубировании нуклеосом с флуоресцентно-мечеными пептидами с последующим анализом образующихся комплексов методом нативного гель-электрофореза.

Были реконструированы модельные моноклеосомы на основе ДНК-матрицы длиной 147 п.н., меченной флуорофором FAM. Чистота использованного пептида была определена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и составила 76,5%. Далее нуклеосомы в концентрации 57 нМ инкубировали в присутствии различных концентраций пептида LANA, несущего флуорофор Cy5 (см. Материалы и методы). После инкубации смесь была проанализирована с помощью метода гель-электрофореза и получены флуоресцентные изображения гелей в спектральных диапазонах (каналах), соответствующих меткам FAM и Cy5 (рисунок 1А).

На изображениях видно, что при увеличении концентрации пептида LANA интенсивность сигнала в Су5-канале в полосе нуклеосом увеличивалась. Это свидетельствует об образовании комплексов между пептидами и нуклеосомами. Отрицательно заряженные нуклеосомы мигрируют в геле с положительно заряженным пептидом LANA, в то время как свободный пептид остается

на старте геля. Нами также были проведены измерения при концентрации нуклеосом в реакционной смеси, равной 115 нМ (данные не показаны). В этом случае мы не наблюдали вхождение нуклеосом в гель. Данное явление может объясняться неспецифической агрегацией и образованием физического геля между нуклеосомами и пептидами при повышенной концентрации нуклеосом.

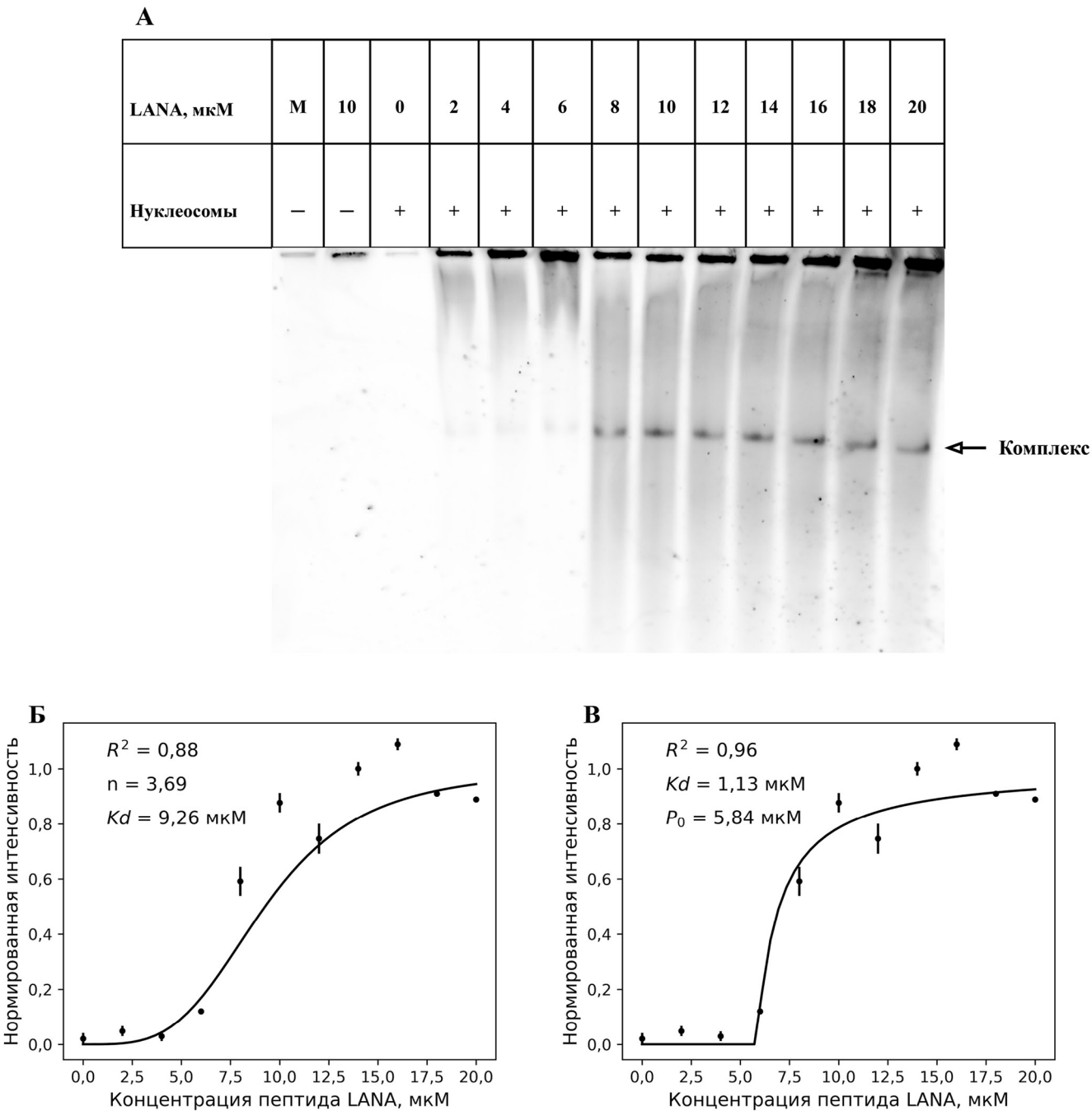


Рисунок. Анализ комплекса пептида LANA с нуклеосомой методом геля-электрофореза. **А** – Электрофореграммы свободного пептида LANA в концентрации 10 мкМ (вторая дорожка), свободных нуклеосом (57 нМ, третья дорожка) и комплексов пептида LANA (2–20 мкМ с шагом 2 мкМ) с нуклеосомами (4–13 дорожка). Разделение проводили в 6%-ном полиакриламидном геле. Детекция по флуоресценции Су5 в составе пептида LANA; М – меченые маркеры ДНК (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, США, первая дорожка). **Б** – Зависимость нормированной интенсивности флуоресценции комплекса пептида LANA с нуклеосомой от концентрации пептида. Данные нормированы и аппроксимированы с использованием уравнения Хилла (1). **В** – Зависимость нормированной интенсивности флуоресценции комплекса пептида LANA с нуклеосомой от концентрации пептида. Данные нормированы и аппроксимированы с использованием модифицированного уравнения Хилла (2).

При анализе результатов мы использовали различные математические модели. Во всех случаях измерялся сигнал Су5 как функция от концентрации пептида. Согласно уравнению Хилла, в этом случае интенсивность сигнала будет пропорциональна:

$$I([P]) \sim \theta([P]) [N]k,$$

где I — сигнал Су5, $[N]$ — концентрация нуклеосом, k — количество сайтов связывания на нуклеосоме. В нашем эксперименте концентрация нуклеосом и количество сайтов связывания k являлись фиксированными, поэтому нормированная на максимум интенсивность сигнала может быть аппроксимирована оригинальным уравнением Хилла (1). Это справедливо, так как приближение работает при любых значениях коэффициента Хилла и все данные были нормированы на максимальное значение интенсивности сигнала.

Первая модель представляла собой классическое уравнение Хилла (1). В рамках данной модели была проведена аппроксимация константы связывания и коэффициента Хилла. K_d составила 9,26 мкМ, $n = 3,69$, для оценки совпадения модели с данными использовался коэффициент детерминации (R^2), который для данной модели составил 0,88 (рисунок 1Б). Такое большое значение коэффициента Хилла обычно объясняют наличием более трех сайтов связывания и высокой кооперативностью взаимодействия. Однако известно, что на поверхности нуклеосомы расположены всего два сайта для связывания пептида. Это ставит под сомнение наблюдаемую высокую кооперативность взаимодействия (даже при взаимодействии гемоглобина с кислородом коэффициент Хилла составляет от 1,7 до 3,2 [12]). Для наличия кооперативности необходимы достаточно сложные механизмы, а с точки зрения электростатических взаимодействий связывание положительно заряженных пептидов рядом друг с другом должно приводить к кооперативности с $n < 1$. Поэтому в качестве альтернативной гипотезы может быть рассмотрена возможность неспецифического взаимодействия пептида с нуклеосомной ДНК. В то же время, ранее проводились соответствующие измерения и было показано, что пептид не взаимодействует с ДНК [13]. Нами было выдвинуто предположение, что пептид мог расходоваться на неспецифическую адсорбцию во время инкуба-

ции с нуклеосомами, и для учета этого явления была произведена модификация уравнения Хилла (2). В рамках данной модели была выполнена аппроксимация константы диссоциации и количества пептида, расходующегося на адсорбцию (исходили из приближения, что на адсорбцию всегда расходуется одинаковое количество пептида). Для этой модели при $n = 1$ получили $K_d = 1,13$ мкМ, $P_0 = 5,84$ мкМ, $R^2 = 0,96$ (рисунок 1В). Как видно, данная модель позволила аппроксимировать результаты со значительно лучшим коэффициентом детерминации. Получившиеся результаты отличаются от данных, приведенных в других работах [6, 7], что может объясняться использованием в нашем исследовании буфера с более высокой концентрацией соли (Tris-HCl 20 мМ, KCl 150 мМ), содержащего ионы калия, а не натрия, что ближе к физиологическим условиям. В присутствии ионов калия структура нуклеосом может меняться по сравнению с их структурой в растворах, содержащих ионы натрия [14]. Увеличение же концентрации соли влечет за собой увеличение ионной силы раствора, которая, в свою очередь, может влиять на величину константы диссоциации комплексов путем создания ионной шубы на поверхности пептида и сайта связывания, так как известно, что растворитель и ионы пронизывают структуру нуклеосомы, в том числе образуют области повышенной концентрации около кислотного лоскута [15].

Таким образом, в данной статье нами представлена оригинальная методика измерения константы связывания пептидов с нуклеосомой, основанная на методе гель-электрофореза в условиях, близких к физиологическим. Измеренная в этих условиях константа диссоциации, на наш взгляд, более корректно отражает способность пептида LANA взаимодействовать с кислотным лоскутом нуклеосом и является отправной точкой для дальнейших исследований и дизайна терапевтических пептидов, обладающих заданной аффинностью к поверхности нуклеосомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №19-74-30003). Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Horn V., Ingen van H. Recognition of nucleosomes by chromatin factors: lessons from data-driven docking-based structures of nucleosome-protein complexes // *Chromatin and Epigenetics* / Eds. C. Logie and T.A. Knoch. IntechOpen, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.81016.

2. Armeev G.A., Gribkova A.K., Pospelova I., Komarova G.A., Shaytan A.K. Linking chromatin composition and

structural dynamics at the nucleosome level // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019. Vol. 56. P. 46–55.

3. Kalashnikova A.A., Porter-Goff M.E., Muthurajan U.M., Luger K., Hansen J.C. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure // *J. R. Soc. Interface.* 2013. Vol. 10. N 82: 20121022

4. Barbera A.J., Chodaparambil J.V., Kelley-Clarke B., Joukov V., Walter J.C., Luger K., Kaye K.M. The nucleosomal

surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA // *Science*. 2006. Vol. 311. N 5762. P. 856–861.

5. Adhireksan Z., Palermo G., Riedel T., Ma Z., Muhammad R., Rothlisberger U., Dyson P.J., Davey C.A. Allosteric cross-talk in chromatin can mediate drug-drug synergy: 1 // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. N 1: 14860.

6. Beauchemin C., Moerke N.J., Faloon P., Kaye K.M. Assay development and high-throughput screening for inhibitors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus N-terminal latency-associated nuclear antigen binding to nucleosomes // *J. Biomol. Screen.* 2014. Vol. 19. N 6. P. 947–958.

7. Teles K., Fernandes V., Silva I., Leite M., Grisolia C., Lobbia V.R., van Ingen H., Honorato R., Lopes-de-Oliveira P., Treptow W., Santos G. Nucleosome binding peptide presents laudable biophysical and in vivo effects // *Biomed. Pharmacother.* 2020. Vol. 121: 109678.

8. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Chromatin Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 523 / Ed. S. Chellappan. Clifton: Humana Press, 2009. P. 109–123.

9. Lowary P.T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 276. N 1. P. 19–42.

10. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., et al. Fiji: an open-source platform for biological-image

analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9. N 7. P. 676–682.

11. Millman K.J., Aivazis M. Python for scientists and engineers // *Comput. Sci. Eng.* 2011. Vol. 13. N 2. P. 9–12.

12. Weiss J.N. The Hill equation revisited: uses and misuses // *FASEB J.* 1997. Vol. 11. N 11. P. 835–841.

13. Chodaparambil J.V., Barbera A.J., Lu X., Kaye K.M., Hansen J.C., Luger K. A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction: 11 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Vol. 14. N 11. P. 1105–1107.

14. Lyubitelev A.V., Kudryashova K.S., Mikhaylova M.S., Malyuchenko N.V., Chertkov O.V., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P. Change in linker DNA conformation upon histone H1.5 binding to nucleosome: Fluorescent microscopy of single complexes // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 2. P. 108–113.

15. Shaytan A.K., Armeev G.A., Goncareenco A., Zhurkin V.B., Landsman D., Panchenko A.R. Coupling between histone conformations and DNA geometry in nucleosomes on a microsecond timescale: atomistic insights into nucleosome functions // *J. Mol. Biol.* 2016. Vol. 428. N 1. P. 221–237.

Поступила в редакцию 05.08.2020 г.

После доработки 07.10.2020 г.

Принята в печать 14.10.2020 г.

SHORT COMMUNICATION

Determination of the binding constant of LANA protein fragment with nucleosome

R.V. Novikov^{1,2,†}, E.A. Bondarenko^{1,†} , N.V. Malyuchenko¹, A.V. Feofanov^{1,3}, V.M. Studitsky^{1,4}, A.K. Shaytan^{1,2,*} 

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

²“Sirius” Science and Technology University, Olympic str., 1, Sochi, 354340, Russia;

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, Moscow, 117997, Russia;

⁴Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center; Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

*e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru

†contributed equally

On the surface of the nucleosome, there are many regions for interaction with chromatin proteins, but an acidic patch, a negatively charged region formed by the residues of the histone H2A/H2B dimer, is especially prominent. The acidic patch is a target for anti-cancer drugs and interaction locus for various pathogens. For instance, it was shown that this region is the binding site of the LANA protein of human gammaherpesvirus 8 and tethers the virus episomes to mitotic chromosomes. The development of methods for analyzing the binding of various compounds to nucleosomes is necessary both for understanding the mechanisms of chromatin regulation and for the therapeutic agents design. In this work, we propose a technique and measure the binding constant of the LANA

protein fragment to nucleosome. In contrast to previous studies, the measurements were carried out at a physiological salt concentration in the buffer solution. The proposed technique is based on the signal detection from the fluorescently labeled peptides after the separation of complexes of nucleosomes with peptides by gel electrophoresis. The paper also discusses mathematical models for analyzing the interaction between peptides and nucleosome and possible factors that can affect it.

Keywords: *nucleosome, LANA, binding constant, gel electrophoresis, acidic patch, Hill equation*

Сведения об авторах

Новиков Роман Вячеславович — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: novikov.roman.2017@post.bio.msu.ru

Бондаренко Елена Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: el.bondarenko@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5009-0863>

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

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Шайтан Алексей Константинович — канд. физ-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0312-938X>

**УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ
«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» в 2020 году**

<i>От редактора</i>	<i>№ Стр.</i>
<i>Кирпичников М.П., Моргунова Г.В., Хохлов А.Н.</i> Наш журнал – 2020: что и как мы публикуем	1 3
<i>Хохлов А.Н.</i> Как наукометрия стала самой важной наукой для исследователей любых специальностей	4 195
Обзоры	
<i>Борzych А.А., Виноградова О.Л., Тарасова О.С.</i> Диафрагма: связь регуляции кровообращения с особенностями сократительной функции	2 55
<i>Воробьева Н.В.</i> Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты	4 210
<i>Граф А.В., Хиразова Е.Э., Маслова М.В., Соколова Н.А.</i> Обестатин и его фрагменты: новый подход к регуляции массы тела в норме и при патологии	2 65
<i>Моргунова Г.В.</i> Клетки китайского хомячка в биотехнологических и геронтологических исследованиях	4 237
<i>Селиванова Е.К., Тарасова О.С.</i> Негеномное действие тиреоидных гормонов: роль в регуляции сосудистой системы	4 226
<i>Чайка С.Ю.</i> Роль периферического окружения рецепторов нейронов в восприятии стимулов сенсорными органами насекомых: факты и гипотезы	4 200
<i>Шамрайчук И.Л., Белякова Г.А., Еремина И.М., Кураков А.В., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е.</i> Протеолитические ферменты грибов и их ингибиторы как перспективные биоцидные средства антифунгального действия	3 123
Оригинальные исследования	
<i>Акиншина Н.Г., Дусчанова Г.М., Азизов А.А., Халмурзаева А.И., Тодерич К.Н.</i> Ксероморфные признаки листьев <i>Liriodendron tulipifera</i> L. (Magnoliaceae) в засушливом климате Центральной Азии	4 251
<i>Антонова Е.П., Илюха В.А., Калинина С.Н.</i> Влияние фотопериодических условий Северо-Запада России и экзогенного мелатонина на физиолого-биохимические показатели сирийского хомяка (<i>Mesocricetus auratus</i>)	3 145
<i>Ахова А.В., Ткаченко А.Г.</i> Роль вторичного окислительного стресса в бактерицидном действии антибиотиков	4 258
<i>Баженов М.С., Черноок А.Г., Дивашук М.Г.</i> Молекулярный анализ генов сигнального пути гиббереллинов у ржи посевной (<i>Secale cereale</i> L.)	3 153
<i>Бондорина И.А., Кабанов А.В., Мамаева Н.А., Хохлачева Ю.А.</i> Коллекционный фонд лаборатории декоративных растений ГБС РАН: исторический аспект и современное состояние	2 100
<i>Боне К.Д., Бочаркина Ю.В., Карлов Г.И., Разумова О.В.</i> Использование межмикросателлитных маркеров для анализа полиморфизма облепихи крушиновидной (<i>Hipporhaë rhamnoides</i> L.) различного происхождения	1 43
<i>Бубнова Е.Н., Грум-Гржимайло О.А., Козловский В.В.</i> Состав и структура сообществ мицелиальных грибов в донных грунтах Белого моря	3 182
<i>Волох О.И., Армеев Г.А., Трифонова Е.С., Соколова О.С.</i> Исследование влияния однонитевого разрыва на механические параметры ДНК методом молекулярной динамики	3 164
<i>Воробьева Н.В., Черняк Б.В.</i> NADPH-оксидаза модулирует Ca ²⁺ -зависимое образование нейтрофильных внеклеточных ловушек	3 131
<i>Воробьева О.В., Исакова Е.Ф., Заец М.А., Мерезликин А.Ю., Самойлова Т.А.</i> Токсичность иона алюминия для <i>Daphnia magna</i> Straus в зависимости от жесткости природной и искусственной воды	4 273

Гвоздев Д.А., Максимов Е.Г., Пащенко В.З. Фотовыцветание молекул фталоцианинов в составе комплекса с коллоидными квантовыми точками	1	9
Еникеев Р.Р., Татарина Н.Ю., Захарчук Л.М. Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> , выделенных из образцов, доставленных с Международной космической станции	4	265
Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А. Половые особенности поведения крыс с фетальным вальпроатным синдромом	2	107
Котлярова М.С., Солдатенко А.С., Архипова А.Ю., Бессонов И.В., Давыдова Л.И., Мойсенович А.М., Богуш В.Г., Дебабов В.Г., Штиль А.А., Мойсенович М.М., Шайтан К.В. Фотоотверждаемые пленки на основе фиброина и желатина для регенерации кожных покровов.....	1	23
Кузьмин В.С., Иванова А.Д., Пустовит К.Б., Абрамочкин Д.В. Изменения электрофизиологических характеристик рабочего предсердного миокарда крысы при его липотрансфекции микроРНК miR-1-3p, miR-153-3p и miR-133a-3p	1	31
Лукиянова А.А., Корниенко Е.И., Виган П.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Осмоловский А.А. Секретция микромицетами протеиназ с активностью, подобной активности белков системы гемостаза.....	1	37
Малюченко Н.В., Кошкина Д.О., Коровина А.Н., Герасимова Н.С., Кирпичников М.П., Студитский В.М., Феофанов А.В. Влияние госсипола на структуру нуклеосом	3	170
Негашева М.А., Зимица С.Н., Хафизова А.А., Сиразетдинов Р.Э., Синева И.М. Эпохальные изменения морфотипа современного человека (по антропометрическим данным ретроспективного исследования московской молодежи).....	1	15
Никишова Е.Р., Радченко И.Г., Белевич Т.А. Мелкие фототрофные флагоеллы Белого моря: сезонная динамика и роль в планктонных и ледовых сообществах	3	176
Осмоловский А.А., Орехова А.В., Конти Э., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Получение и стабильность комплексного препарата протеиназ <i>Aspergillus ochraceus</i> L-1 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью.....	3	158
Рафикова Г.Ф., Кузина Е.В., Коришкова Т.Ю., Логинов О.Н. Новые штаммы бактерий <i>Pseudomonas laurentiana</i> – перспективные агенты для агробиотехнологии	4	244
Романов Д.В., Ширнин С.Ю., Карлов Г.И., Дивашук М.Г. Цитогенетическое изучение <i>Aegorodum podagraria</i> (Umbelliferae) для ее использования в селекции.....	2	81
Филиппова Г.В., Дарханова В.Г., Строева Н.С., Николаева О.А., Андреева Д.Н. Размножение <i>in vitro</i> , рост и развитие <i>ex situ</i> редкого вида <i>Lilium pensylvanicum</i> Ker.-Gawl. (Liliaceae)	2	87
Чурсина М.А., Негроров О.П. Морфологические тенденции в морфометрии ног в семействе <i>Dolichopodidae</i> (Diptera)	3	138
Шевелева А.А., Митрофанова И.В., Горина В.М., Чирков С.Н. Молекулярный анализ новых крымских изолятов вируса оспы сливы.....	2	93

Мнения

Зворыкин Д.Д. Забота о потомстве у рыбы-ползуна (<i>Anabas testudineus</i>): ошибка или утерянные данные?	4	280
---	---	-----

Краткие сообщения

Воронцова Ю.Е., Акишина А.А., Черезов Р.О., Симонова О.Б. Функциональная активность арил-гидрокарбонового рецептора в первичных культурах клеток остеогенной саркомы человека	4	291
Новиков Р.В., Бондаренко Е.А., Малюченко Н.В., Феофанов А.В., Студитский В.М., Шайтан А.К. Определение константы связывания фрагмента белка LANA с нуклеосомой	4	296
Скоробрехова Е.М. Структура оболочек вокруг метацеркарий трематод <i>Podocotyle atomon</i> (Rudolphi, 1802) во втором промежуточном хозяине.....	4	285

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных Elibrary.ru, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, а английская – в Scopus, Google Scholar, CAB International, Academic OneFile, CAB Abstracts, Gale, Global Health, Health Reference Center Academic, OCLC и Summon by Serial Solutions и др.

Желающим опубликовать свою статью в журнале необходимо сдать вместе с рукописью авторский договор с издателем журнала, заполненный и подписанный всеми авторами. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Форма договора с издателем и дополнительная юридическая информация размещены на сайте «Pleiades Publishing». Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько – по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3500 слов (шрифт Times New Roman, кегль 12, межстрочный интервал – полуторный, отступ – 1,25, выравнивание по ширине), включая список литературы и резюме на английском языке. В отдельных случаях допустимо увеличение объема по согласованию с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (заглавными буквами, полужирным шрифтом), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера**Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}**

¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, СО РАН,
Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение,
Новосибирский государственный университет,
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение (слово «введение» не пишется), материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение (не отделяется от предыдущего текста и не имеет подзаголовка), список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке:

«Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию....», где позднее ответственный секретарь редколлегии укажет дату поступления рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

*Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:***Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis****N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}**

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

²Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia

*e-mail: kolosova@mail.ru

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого, его смысл не терялся и все элементы были отличимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) должен включать не более 25 ссылок. В обзорных статьях возможно увеличение списка литературы по согласованию с редакцией.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные рецензируемые статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие. Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **Тезисы докладов (материалы) конференции.** Авторы (инициалы после фамилии). Название тезисов // Название сборника тезисов (как на обложке сборника). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

5) **Автореферат диссертации.** Автор (инициалы после фамилии). Название: Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. наук. Город, год. Общее количество страниц.

6) **Электронный ресурс.** Название сайта [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). *Дата обращения – это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.*

7) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс] // Название источника. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП – Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry – J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва – М., New York – N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Hayflick L. Progress in cytogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.

Хавинсон В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. exper. биол. мед. 2001. Т. 132. № 8. С. 228–229.

Книга:

Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 pp.

Птушенко Е.С., Иноземцев А.А. Биология и хозяйственное значение птиц Московской области и сопредельных территорий. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1968. 462 с.

Статья в сборнике:

Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilov V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Eds. J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв // Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.) / Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии, 2013. С. 174–176.

Тезисы докладов (материалы) конференции:

Болеева Г.С., Борzych А.А. Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2012», секция «Биология» (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.

Автореферат диссертации:

Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на Севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар. 2012. 23 с.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.07.2014).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Особенности оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м — метр, кг — килограмм, мин — минута, ° — градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия — NaCl, углекислый газ — CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов — обычным шрифтом. Например: ген — *FOXO3*, его продукт — FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Авторам необходимо предложить 2–3 потенциальных рецензентов для своей статьи (предложенные кандидаты не должны иметь с авторами совместных публикаций и не должны работать в той же организации, где работают авторы). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Далее над рукописью работает редактор, исправленный текст и его замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Просьба указывать в тексте письма мобильные телефоны авторов, ответственных за работу над рукописью.