

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 76 • № 3 • 2021 • ИЮЛЬ – СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

От редакторов

- Хохлов А.Н., Моргунова Г.В. Стоит ли преподавать студентам-биологам основы научометрии и правила оформления научных статей, а если стоит, то зачем? 103

Оригинальные исследования

- Мищуков А.А., Бережнов А.В., Кобякова М.И., Евстратова Я.В.,
Мидлян Е.Ю., Холмухамедов Э.Л. Действие противоопухолевого препарата
ONC201 на число митохондриальных нуклеоидов в культуре клеток рака
молочной железы BT474 110
- Михальский А.И., Анисимов В.Н., Жаринов Г.М.
Анализ продолжительности жизни человека в исторической перспективе 118
- Граф А.В., Байжуманов А.А., Маслова М.В., Крушинская Я.В.,
Маклакова А.С., Соколова Н.А., Каменский А.А. Активность
антиоксидантной системы при беременности в норме и при гипоксии 126
- Борзых А.А., Швецова А.А., Кузьмин И.В., Буравков С.В.,
Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Роль активных форм кислорода
в регуляции тонуса артерий дыхательной и локомоторной мышц крысы 134
- Андреева Т.В., Любителев А.В., Малюченко Н.В., Студитский В.М.,
Кирпичников М.П., Феофанов А.В. Влияние линкерной ДНК
на структуру нуклеосом по данным флуоресцентной микроскопии
одиночных частиц 142
- Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А.
Влияние ингибиторов циклооксигеназы эторикоксиба и диклофенака натрия,
а также их комбинаций с мексидолом на поведение крыс 148
- Боздагян М.Е., Орехов Ф.С., Литвинов Д.С., Новоселецкий В.Н.
Молекулярное моделирование HR2- и трансмембранных доменов
префузионного S-белка вируса SARS-CoV-2 155

Мнения

- Куликов А.В., Архипова Л.В. Тестостерон и продолжительность жизни,
или почему женщины живут дольше мужчин. Гипотеза. 163

Краткие сообщения

- Чжан Х., Глухов Г.С., Пустовит К.Б., Качер Ю.Г., Русинова В.С.,
Киселева И.И., Комолятова В.Н., Макаров Л.М., Заклязьминская Е.В.,
Соколова О.С. Фенотипические проявления миссенс-мутации Val93Ile и ее
влияние на функционирование канала Kir2.1 169

Erratum

- Исправление в статье «Способность мексидола усиливать антиэксудативное
действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового
отека у крыс и мышей» 175

CONTENTS

Editorial

- Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Is it worth teaching biology students the basics of scientometrics and the instructions for the design of scientific articles, and if so, why? 103

Research articles

- Mishukov A.A., Berezhnov A.V., Kobyakova M.I., Evstratova Ya.V., Mnelyan E.Yu., Holmuhamedov E.L. Effect of ONC201 antitumor drug on the number of mitochondrial nucleoids in BT474 breast cancer cells in culture 110
- Mikhalski A.I., Anisimov V.N., Zharinov G.M. Analysis of human life span through history 118
- Graf A.V., Baizhumanov A.A., Maslova M.V., Krushinskaya Ya.V., Maklakova A.S., Sokolova N.A., Kamensky A.A. The antioxidant system activity during normal pregnancy and pregnancy following by hypoxic stress 126
- Borzykh A.A., Shvetsova A.A., Kuzmin I.V., Buravkov S.V., Gaynullina D.K., Tarasova O.S. Role of reactive oxygen species in tone regulation of respiratory and locomotor muscle feed arteries in the rat 134
- Andreeva T.V., Lyubitelev A.V., Malyuchenko N.V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Influence of linker DNA on nucleosome structure according to single-particle fluorescence microscopy data 142
- Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Vasilchuk A.G., Voronina T.A. Effect of cyclooxygenase inhibitors etoricoxib and diclofenac sodium as well as their combinations with mexidol on behavior in rats 148
- Bozdaganyan M.E., Orekhov P.S., Litvinov D.S., Novoseletsky V.N. Molecular modeling of HR2 and transmembrane domains of the SARS-CoV-2 S-protein in the prefusion state 155

Opinion articles

- Kulikov A.V., Arkhipova L.V. Testosterone and life span or why women live longer than men. A hypothesis. 163

Short communications

- Zhang X., Glukhov G.S., Pustovit K.B., Kacher Yu.G., Rusinova V.S., Kiseleva I.I., Komolyatova V.N., Makarov L.M., Zaklyazminskaya E.V., Sokolova O.S. Phenotypic manifestations of Val93Ile missense mutation and its influence on Kir2.1 channel functioning 169

Erratum

- Correction to: "Ability of mexidol to enhance antiexudative effect of diclofenac sodium and etoricoxib in rats and mice with carrageenan-induced edema" 175

ОТ РЕДАКТОРОВ

УДК 002:[57.01-08+573]

Стоит ли преподавать студентам-биологам основы наукометрии и правила оформления научных статей, а если стоит, то зачем?

А.Н. Хохлов* , Г.В. Моргунова 

*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

За последние десятилетия подходы к написанию и оформлению научных статей, а также к выбору изданий для публикации учеными результатов своих исследований (как экспериментальных, так и теоретических) кардинально изменились. Значительное внимание большинство специалистов сейчас уделяет формальным рейтингам научных журналов, так как именно они определяют главным образом, насколько велики шансы публикующихся в них ученых на получение грантов для проведения своих исследований. А без серьезного финансирования на современном этапе практически невозможно заниматься не только прикладной, но и фундаментальной наукой. В частности, это стало особенно важным для биологов и специалистов в области биомедицины, работающих в самых разных направлениях, потому что они, как правило, используют в своей работе дорогостоящие оборудование, реактивы и экспериментальных животных. В связи с этим любым ученым, работающим в области Life Sciences, необходимо уметь правильно выбирать журналы для своих публикаций, основываясь на наукометрических показателях изданий. Не менее важной является и проблема оформления научных статей, так как высокорейтинговые журналы отклоняют значительный процент рукописей, не соответствующих предъявляемым требованиям, не только после рецензирования, но и до него (в режиме «rapid rejection»). Авторы настоящей работы считают необходимым введение соответствующих курсов лекций в программы обучения студентов биологических и биомедицинских специальностей. Рассматривается перечень вопросов, которые предлагается затронуть в таких лекциях, среди которых основы наукометрии, работа над списками литературы, поиск возможных заимствований в рукописи, требования к иллюстрациям, соблюдение этических норм, определение принадлежности научного издания к «хищническим», рецензирование научных статей, их корректное структурирование и др.

Ключевые слова: биология, научные публикации, биоэтика, оформление рукописей, списки литературы, наукометрические показатели, платные публикации, рейтинги ученых, научные гранты, обучение

Речь в этой статье пойдет и о наукометрии, и о различных подходах к написанию, оформлению и представлению в научные журналы результатов исследований (либо сформулированных авторами гипотез и теорий) биологами самых разных специальностей. Надо сказать, что подходы эти кардинально изменились в последние годы (два столетия? Но об этом ниже). Нам кажется совершенно обязательным введение соответствующих курсов лекций и семинаров в программу обучения студентов-биологов. И в настоящей работе мы постараемся объяснить почему.

Несколько лет назад один из нас опубликовал пару статей [1, 2], в которых изложил свою точку зрения на преподавание геронтологии и биологии старения студентам соответствующих направлений. Основная идея этих публикаций заключалась в том, что без знания основ данных дисциплин

(определений понятий, основных принципов и подходов к изучению механизмов старения) невозможно адекватно воспринять преподаваемые предметы более «низкого уровня». Иначе говоря, нельзя изучать тонкие механизмы старения и долголетия на клеточном и молекулярном уровне, не имея представления о том, что такое старение, биологический возраст, ожидаемая продолжительность жизни, поперечные и лонгитудинальные исследования, а также о том, как нужно правильно снимать кривые выживания экспериментальных животных и формировать контрольную когорту (кстати, термин «когорта» также часто применяется неправильно, так что его детализация явно была бы не лишней) [3].

Собственно, как нам кажется, сходная идея имеет право на существование и при рассмотрении необходимости преподавания студентам

основ наукометрии и подготовки научных статей. Авторы настоящей публикации в течение многих лет занимаются изданием журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» / «Moscow University Biological Sciences Bulletin» [4, 5]. В связи с тем, что наукометрические показатели этого издания в последние годы устойчиво растут (журнал индексируется практически во всех основных базах глобального цитирования), мы регулярно получаем все больше и больше рукописей – в том числе и тех, которые написаны в соавторстве со студентами и аспирантами, работающими в области биологических и биомедицинских наук. При этом ясно, что во многих случаях их руководители просто не имеют времени для тщательной вычитки текста, написанного молодыми учеными. И это отражается далеко не лучшим образом на качестве статей. К сожалению, большинство авторов заинтересовано в первую очередь в формальных наукометрических показателях изданий и даже не представляют, как на этих показателях может оказаться небрежное оформление их статей [6, 7]. Ради объективности надо заметить, что даже «старшие коллеги» во многих случаях имеют весьма смутное представление о том, как надо правильно оформлять рукописи и что означают наукометрические показатели выбранных ими для публикации результатов своих научных исследований журналов, хотя эти показатели им очень важны для получения грантов, стипендий и высоких оценок при прохождении по конкурсу на научные должности. В частности, как показывает наша практика, многие из авторов не могут объяснить разницу между импакт-фактором, SJR, SNIP и CiteScore, хотя распределение журналов по так называемым «квартилям» (Q1–Q4), очень интересующее всех ученых в настоящее время, по каждому из этих показателей может сильно различаться [7]. В результате довольно часто авторы сталкиваются с ситуацией, когда при отчете по гранту они получают письмо от финансировавшего их исследования научного фонда, из которого следует, что некоторые прикрепленные к отчету публикации не соответствуют формальным требованиям и не могут быть приняты во внимание экспертами фонда. Например, широко распространенный показатель SJR, используемый испанской исследовательской группой SCImago для анализа данных из международной наукометрической базы данных (МНБД) Scopus, часто применяется вместо «классического» импакт-фактора Web of Science (Clarivate Analytics). В частности, многие научные организации используют именно этот показатель для оценки эффективности работы своих научных сотрудников. Некоторые исследователи полагают, что попадание журнала в Q1 по индикатору SJR автоматически означает принадлежность к Q1 по импакт-фактору. Однако это совсем не так. Как правило, SJR гораздо меньше импакт-фактора, так как при его расчете

учитывается не только количество цитирований статей из конкретного журнала, но и качество этих цитирований, определяемое рейтингами цитирующих изданий. Кроме того, в случае «журнальных самоцитирований», т.е. цитирований работ из этого же издания (причем как самими авторами, так и другими исследователями), SJR учитывает только 30% от их суммарного количества, а импакт-фактор – все 100%. Естественно, все цитирующие источники обязательно должны входить в конкретную МНБД – либо в Scopus при расчете SJR, либо в Web of Science – для импакт-фактора. При этом надо иметь в виду, что списки индексируемых журналов в этих МНБД различаются, в связи с чем некоторые журналы могут входить в одну МНБД, но не входить в другую. Понятно, что данное обстоятельство должно влиять на результаты оценки даже одинаковых по сути наукометрических показателей в указанных МНБД.

Надо сказать, что в последнее время все большую популярность завоевывает наукометрический показатель SNIP (МНБД Scopus), разработанный Хенком Мудом [8, 9] и учитывающий различия в показателях цитирования для разных научных областей [7].

Многим, кстати, не приходит в голову, что очень короткие списки литературы в статьях, которые приняты в некоторых областях науки (например, у математиков) отрицательно влияют на наукометрические показатели как научных изданий, так и публикующихся в них авторов [8].

Очень часто нам приходится объяснять авторам, что очень большое количество цитирований их работ не приводит автоматически к повышению их индекса Хирша, так как если у вас цитируют очень много раз всего две работы, то независимо от количества этих цитирований данный показатель все равно будет равен 2.

По-видимому, в сложившейся в настоящее время ситуации с научными публикациями все ученые должны иметь представления об основах наукометрии, чтобы трезво оценивать свои возможности в плане получения грантов и прохождения по конкурсу на престижные должности в своих научных организациях.

Наконец, необходимо иметь в виду, что даже высокорейтинговые журналы периодически исключаются из МНБД Scopus и Web of Science (и примеров этому для биологических и биомедицинских журналов довольно много). Тогда их рейтинг просто аннулируется и, как уже упоминалось выше, соответствующие научные фонды перестают учитывать опубликованные в них работы, даже если публикация случилась до исключения издания из МНБД. В таких случаях авторы могут столкнуться с ситуацией, в которой они просто не в состоянии сдать в фонды свой годовой отчет.

Теперь о том, каковы в настоящее время требования к содержанию и оформлению научных

статей, поступающих в биологические и биомедицинские журналы. Как мы уже упомянули выше, некоторые из этих требований серьезно изменились за последние пару веков. И в первую очередь это касается этики исследований в биологии и медицине.

В последние годы в подавляющем большинстве биологических и медицинских изданий стали обязательными требования к авторам указать, насколько их работа соответствует этическим требованиям к экспериментам, проводимым на животных или людях [10–12]. Эти требования formalизованы в целом ряде рекомендательных документов, принятых как международным сообществом, так и соответствующими комитетами большинства развитых стран (см., например, *Universal Declaration on Bioethics and Human Rights* от 19 октября 2005 г. на портале ЮНЕСКО, unesco.org).

В 1796 г. Эдвард Дженнер втер в царапину на теле восьмилетнего мальчика содержимое нескольких пустул его матери, заразившейся коровьей оспой [13, 14]. Прививка прошла без особых последствий, и через некоторое время Дженнер попытался заразить мальчика натуральной оспой, однако болезнь не развилаась. В 1798 г. Дженнер издал брошюру [15] с подробным описанием своих экспериментов, и эта публикация заложила основы для дальнейших работ по вакцинации от опасных инфекций. Если бы ученый жил на 200 лет позже, он никогда бы не смог провести такие эксперименты без риска попасть в тюрьму и уж тем более не смог бы опубликовать полученные данные, ибо ни одно современное издательство не согласилось бы принять статью с результатами несанкционированных рискованных опытов на людях, не имеющих представления о том, чем они рискуют. Как ни печально, значительная часть молодых авторов, присылающих нам свои работы, даже не знает о существовании в их организациях комитетов по этике, с которыми они обязаны согласовывать свои исследования, если в них задействованы люди или экспериментальные животные.

Еще одна проблема касается статистической обработки данных биологических и биомедицинских экспериментов [16]. Во многих работах, которые присылают к нам в журнал, и даже в статьях, уже опубликованных в других изданиях соответствующего профиля, мы часто видим, что результаты исследований статистически обработаны некорректно либо статистическая обработка вообще отсутствует. На гистограммах с данными могут быть представлены столбики разной высоты, однако без «усов». Очень часто в статье может идти речь об обнаруженных «тенденциях», а не о достоверных различиях. Как нам заявил автор одной из микробиологических работ, «у нас не принято статистически анализировать полученные данные». И это при том, что в статье приводились результаты сравнения влияния различных

культуральных сред на рост бактерий! Как можно в такой работе сделать какие-либо выводы без использования статистических методов, нам не понятно. Особенно печально, что в ответ на наши замечания автор прислал несколько своих уже опубликованных во вполне приличных журналах статей, в которых статистическая обработка результатов действительно отсутствовала!

Надо сказать, что даже в тех случаях, когда авторы указывают в «Материалах и методах», какими статистическими методами и программами они пользовались, правомочность их подходов вызывает большие сомнения как у рецензентов, так и у редакторов нашего издания. В частности, очень часто игнорируется то обстоятельство, что сравнивать две группы данных с помощью параметрических критериев (например, теста Стьюдента) можно только в случае, если эти данные подчиняются нормальному распределению. Ну или хотя бы, если их «ненормальность» не доказана. Впрочем, в некоторых случаях авторы даже не знают о существовании специальных программ для статистического анализа научных результатов и используют только t-тест, встроенный в MS Excel.

Еще одна проблема касается пристатейных списков литературы. К сожалению, практически во всех поступающих к нам статьях такие списки оформлены некорректно [17]. И это проблема не только нашего журнала. Один из нас еще помнит то время, когда для проверки всех ссылок (а их было несколько сотен) в книге, которую он писал, ему приходилось много раз посещать Российскую государственную библиотеку (тогда она называлась «Государственная библиотека СССР им. В. И. Ленина»). Правда, объективности ради стоит заметить, что в то время большинство отечественных ученых публиковались в советских журналах, которые при оформлении списков литературы придерживались одинакового стандарта – ГОСТ. Сейчас в российских журналах требования к такому оформлению могут сильно различаться, а в зарубежных изданиях они могут быть совершенно разными. Только Google Scholar предлагает 5 вариантов оформления ссылки на найденную работу – MLA, APA, Chicago, Harvard, Vancouver. При работе с различными «менеджерами ссылок» (BibTeX, EndNote, Reference Manager, ProCite, RefWorks, RefME, Zotero, Mendeley и др.) количество таких вариантов возрастает многократно. Это способствует путанице при оформлении списков литературы. Конечно, можно тщательно проштудировать «Правила для авторов» издания, в котором планируется опубликовать статью, а также скачать в качестве образцов несколько напечатанных там работ, но, по-видимому, большинству авторов на это просто не хватает сил и времени.

У нас в журнале при оформлении ссылок мы используем исторически сложившуюся некую «смесь» из стандарта Vancouver и ГОСТа, что, ко-

нечно, тоже не очень помогает авторам при оформлении рукописей. По-видимому, в ближайшее время мы постараемся модифицировать наши требования к спискам литературы, максимально приблизив формат ссылок к какому-либо международному стандарту.

В наших предыдущих публикациях мы уже рассмотрели возможные походы к поиску и формированию необходимых ссылок для списка литературы [7, 17].

Выше была упомянута проблема с короткими списками литературы в научных статьях. Однако «кривые» списки литературы очень вредны не только для представителей международного научного сообщества, которые читают опубликованные работы, но и для самих авторов научных статей. Дело в том, что некорректная ссылка на публикацию уменьшает ее «видимость» и цитируемость – в том числе, это касается и тех собственных работ, которые цитируются авторами соответствующих статей. Если кто-то написал «как мы показали в предыдущей работе», но ссылка в списке литературы никуда не ведет, то это значит, что данную «предыдущую работу» найти будет очень трудно, поэтому у многих читателей возникнет сомнение в ценности результатов, полученных в настоящем исследовании. Соответственно, «битая» ссылка на метод, «использованный ранее», приведет к тому, что многие просто не поймут, каким образом проводились эксперименты. Да и на цитировании работ (как своих, так и чужих) это отразится отрицательно.

Как ни печально, в последние годы сложилось широко распространенное мнение, что грамматика и стиль в научных статьях далеко не так важны, как корректное изложение полученных результатов и разработанных концепций. Однако, как показывает наша многолетняя редакторская практика, очень часто как раз изобилие грамматических и стилистических ошибок в тексте просто не позволяет понять, что хотели сказать авторы. Впрочем, во многих случаях у рецензентов складывается впечатление, что они все поняли правильно, хотя в ответе авторов указывается, что они имели в виду совсем не то, о чем пишет рецензент. В общем, как с той фразой «казнить нельзя помиловать». К сожалению, многие отечественные биологические журналы не могут (или не хотят?) заниматься тщательной правкой рукописей, что часто приводит к публикации текстов, однозначная интерпретация которых просто невозможна. И проблема эта, надо заметить, свойственна не только русскоязычным публикациям [18].

Хотелось бы также отметить, что многие авторы не знают о существовании такого явления, как ретракция. Они полагают, что если опубликовали статью, то она теперь навечно вписана в анналы мировой науки. На самом деле это далеко не так. Если уже после публикации статьи выясняется,

что она не соответствует требованиям к научным работам (несоблюдение этических норм, заимствования, ошибочные подача или обработка результатов и т.п.), она может быть ретрактирована, т.е. признана несуществующей [19, 20]. В результате на нее нельзя ссылаться, и она не учитывается соответствующими финансирующими научные исследования организациями. Так что не исключено, что полученный грант придется вернуть.

Кроме того, как нам представляется, независимо от того, связана ли научная публикация с какими-то грантами, авторам не стоит ее «бросать на произвол судьбы». В частности, они сами могут иногда цитировать свою работу (естественно, не злоупотребляя этим), а также упоминать ее в социальных сетях, способствуя увеличению так называемых альтметрик [7]. Последние в настоящее время стали важной составляющей формирования рейтингов как ученых, так и научных журналов. Информирование пользователей социальных сетей о своих научных результатах позволяет, в том числе, привлечь новых читателей к статьям на сайтах соответствующих издательств.

Отдельно хотелось бы подробнее остановиться на уже упомянутой выше проблеме заимствований. Подавляющее большинство «правильных» научных изданий проверяет поступающие в редакцию рукописи на наличие плагиата. Существует целый ряд программных продуктов, в том числе и бесплатных, которые позволяют самостоятельно оценить процент заимствований (включая «самоплагиат») в уже написанной работе и понять, с чем он связан. В частности, повторения ранее опубликованной информации в разделе «Материалы и методы» вполне допустимы, а вот вторичное использование целых кусков текста во введении или заключении совсем недопустимо. Мы уж не говорим о повторной публикации экспериментальных данных (таблицы, рисунки и пр.) в новой работе, что считается абсолютным нарушением этических принципов [21, 22].

Использование иллюстраций для научных статей также имеет много подводных камней. В частности, большинство изданий не принимает рисунки, если их реальное (не интерполированное!) разрешение меньше 300 dpi (довольно часто – если оно меньше 1200 dpi). Существует целый ряд приемов, обеспечивающих создание рисунков с высоким разрешением даже при использовании программ, которые формально такое разрешение не поддерживают.

Однако гораздо более серьезная проблема заключается в том, что многие авторы используют в своих статьях (например, в обзорах) рисунки из других работ, полагая, что достаточно привести в подрисуночной подписи ссылку на исходную публикацию. На самом деле в таких случаях необходимо получить официальное разрешение соответствующего издательства (и лишь иногда – са-

мых авторов содержащей иллюстрацию статьи) на воспроизведение копируемого материала. Даже то, что авторы внесли некоторые изменения в рисунок, не освобождает их от необходимости запрашивать такое разрешение. Только если оно получено или издательство (либо авторы оригинального источника, если все права на опубликованные материалы принадлежат именно им) сообщило, что разрешение не требуется, можно вставлять в статью заимствованный материал. Естественно, даже при наличии официального разрешения ссылка на первоисточник обязательна.

Готовя научную работу к публикации, авторы должны понимать, что хотя публикация глав в монографиях или сборниках статей значительно облегчена по сравнению с публикацией работ в журналах, такие статьи читают и цитируют гораздо реже (в разы!). Кроме того, достаточно часто таким публикациям не присваивается свой собственный цифровой индикатор DOI (он может быть один на всю книгу), что сильно ухудшает видимость (visibility), а соответственно, и цитируемость работы. Если же речь идет о сборниках тезисов конференций, то цитирование таких публикаций практически полностью отсутствует в серьезных научных изданиях.

Появление в последние годы большого количества журналов открытого доступа, которые берут деньги с авторов статей (а не существуют за счет подписки), на наш взгляд, отразилось далеко не лучшим способом на качестве публикуемых работ. Подробно этот вопрос также был рассмотрен нами ранее [6, 7]. К сожалению, многие из платных журналов являются так называемыми «хищниками» [23–25], основной целью которых является получение прибыли, что приводит к резкому снижению требований к качеству поступающих в редакцию рукописей. Нам кажется, что если вы уверены в корректности и ценности публикуемого материала, то направлять статьи нужно именно в подписные журналы. Кстати, до сих пор как раз такие журналы возглавляют списки высокорейтинговых изданий [26, 27].

В связи со всем вышеизложенным нам представляется совершенно необходимым введение

в программу обучения студентов, обучающихся по биологическим и биомедицинским специальностям, соответствующих курсов лекций, в которых бы рассматривались следующие вопросы:

- 1) Что такое наукометрия?
- 2) Наукометрические показатели авторов и журналов
- 3) Сравнение различных наукометрических индикаторов
- 4) Основные наукометрические базы данных
- 5) О возможных заимствованиях в рукописи
- 6) Признаки «хищнических» журналов и журналов-клонов
- 7) Где и как искать правильные ссылки на научные статьи?
- 8) Работа над списками литературы
- 9) Требования к соблюдению этических норм при проведении экспериментов на людях и животных и к опубликованию полученных в таких исследованиях результатов
- 10) О конфликтах интересов
- 11) Требования к статистической обработке результатов экспериментов
- 12) Оформление иллюстраций и использование рисунков из чужих статей
- 13) Требования к грамматике и стилю научных статей
- 14) В какие месяцы года выгоднее публиковать статьи и почему?
- 15) Ретракция опубликованных статей

Список этот, конечно, не полный и может быть дополнен при необходимости.

И в заключение хотелось бы заметить, что изложенные в настоящей статье идеи и подходы к обучению могли бы оказаться полезными не только для биологов, но и для студентов и аспирантов других специальностей, которые подразумевают проведение исследовательской работы с последующим опубликованием полученных результатов в научных изданиях – как российских, так и международных.

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов. Финансирование работы отсутствовало.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khokhlov A.N., Wei L., Li Y., He J. Teaching cytogerontology in Russia and China // Adv. Gerontol. 2012. Vol. 25. N 3. P. 513–516.
2. Wei L., Li Y., He J., Khokhlov A.N. Teaching the cell biology of aging at the Harbin Institute of Technology and Moscow State University // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 1. P. 13–16.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Khokhlov A.N. How scientometrics became the most important science for researchers of all specialties // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 4. P. 159–163.

7. Хохлов А.Н., Моргунова Г.В. Научные публикации – хорошие, плохие, за пригоршню долларов // Научный редактор и издатель. 2021. Т. 6. № 1. С. 59–67.
8. Moed H.F. Measuring contextual citation impact of scientific journals // J. Informetr. 2010. Vol. 4. № 3. P. 265–277.
9. Moed H.F. Comprehensive indicator comparisons intelligible to non-experts: The case of two SNIP versions // Scientometrics. 2016. Vol. 106. № 1. P. 51–65.
10. Bryant J, Baggott la Velle L. A bioethics course for biology and science education students // J. Biol. Educ. 2003. Vol. 37. № 2. P. 91–95.
11. Mandal J., Ponnambath D.K., Parija S.C. Bioethics: A brief review // Trop. Parasitol. 2017. Vol. 7. № 1. P. 5–7.
12. Chan A.H., Whitton B.A., Chan G.Y. The need for learning bioethics and law for biology students // J. Biol. Educ. 2020. DOI: 10.1080/00219266.2020.1841667.
13. Lakhani S. Early clinical pathologists: Edward Jenner (1749–1823) // J. Clin. Pathol. 1992. Vol. 45. № 9. P. 756–758.
14. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. // Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.) 2005. Vol. 18. № 1. P. 21–25.
15. Jenner E. An inquiry into the causes and effects of variolae vaccinae, a disease discovered in some western counties of England. London: Sampson Low, 1798. 75 pp.
16. Altman D.G. Poor-quality medical research: what can journals do? // J. Am. Med. Assoc. 2002. Vol. 287. № 21. P. 2765–2767.
17. Хохлов А.Н., Клебанов А.А., Моргунова Г.В. Способы 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 изда-тельство», 2018. С. 152–157.
18. Habibzadeh F., Shashok K. Plagiarism in scientific writing: words or ideas? // Croat. Med. J. 2011. Vol. 52. № 4. P. 576–577.
19. Fang F.C., Casadevall A. Retracted science and the retraction index // Infect. Immun. 2011. Vol. 79. № 10. P. 3855–3859.
20. Boschiero M.N., Carvalho T.A., de Lima Marson F.A. Retraction in the era of COVID-19 and its influence on evidence-based medicine: is science in jeopardy? // Pulmonology. 2021. Vol. 27. № 2. P. 97–106.
21. Bretag T., Mahmud S. Self-plagiarism or appropriate textual re-use? // J. Acad. Ethics. 2009. Vol. 7. № 3. P. 193–205.
22. Wager E. Defining and responding to plagiarism // Learn. Publ. 2014. Vol. 27. № 1. P. 33–42.
23. Beall J. Predatory publishers are corrupting open access // Nature. 2012. Vol. 489. № 7415. P. 179.
24. Beall J. What I learned from predatory publishers // Biochem. Med. (Zagreb). 2017. Vol. 27. № 2. P. 273–278.
25. Kendall G. Beall's legacy in the battle against predatory publishers // Learn. Publ. 2021. Vol. 34. № 3. P. 379–388.
26. Calver M.C., Bradley J.S. Patterns of citations of open access and non-open access conservation biology journal papers and book chapters // Conserv. Biol. 2010. Vol. 24. № 3. P. 872–880.
27. Björk B.C., Solomon D. Open access versus subscription journals: a comparison of scientific impact // BMC Medicine. 2012. Vol. 10: 73.

Поступила в редакцию 18.06.2021 г.

После доработки 29.06.2021 г.

Принята в печать 02.07.2021 г.

EDITORIAL

Is it worth teaching biology students the basics of scientometrics and the instructions for the design of scientific articles, and if so, why?

A.N. Khokhlov^{*} , G.V. Morgunova 

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

Over the past decades, the approaches to writing and formatting scientific articles, as well as to the choice of editions for publication by scientists of the results of their research (both experimental and theoretical) have changed dramatically. Much attention is now paid by most specialists to formal ratings of scientific journals, since it is they which determine mainly how great the chances of the scientists published in them are to get grants for their research. And without serious funding at the present stage, it is practically impossible to engage in not only applied, but also fundamental science. In particular, this has become especially important for biologists and biomedical specialists working in a wide variety of fields, because they tend to use expensive equipment, reagents and experimental animals in their work. In this regard, any scientists working in the field of Life Sciences must be able to choose the right journals for their publications, based on the scientometric indicators of the editions. No less important is the

problem of formatting/designing scientific articles, since high ranked journals reject a significant percentage of manuscripts that do not meet the requirements, not only after peer-reviewing, but also before it (in the “rapid rejection” mode). The authors of this article consider it necessary to introduce appropriate courses of lectures into the curricula of students of biological and biomedical specialties. A list of issues that are proposed to be touched in such lectures is considered, including the basics of scientometrics, work on lists of references, search for possible borrowings in a manuscript, requirements for illustrations, compliance with ethical standards, determining whether a scientific publication is a “predatory” one, peer-reviewing scientific articles, their correct structuring, etc.

Keywords: *biology, scientific publications, bioethics, design of manuscripts, reference lists, scientometric indicators, paid publications, scientists' ranking, scientific grants, teaching*

Сведения об авторах

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>

Моргунова Галина Васильевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ, ответственный секретарь редколлегии журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» / “Moscow University Biological Sciences Bulletin”. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5259-0861>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.085.23

Действие противоопухолевого препарата ONC201 на число митохондриальных нуклеоидов в культуре клеток рака молочной железы BT474

А.А. Мишуков¹ , А.В. Бережнов² , М.И. Кобякова³ , Я.В. Евстратова³ ,
Е.Ю. Миндлян³ , Э.Л. Холмухамедов³, * 

¹*Биотехнологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 51;*

²*Институт биофизики клетки, Российской академии наук, Россия,
Московская область, г. Пущино, 142290, ул. Институтская, д. 3;*

³*Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Российской академии наук,
Россия, Московская область, г. Пущино, 142290, ул. Институтская, д. 3*

**e-mail: ekhson@gmail.com*

Исследовано действие цитостатического противоопухолевого препарата ONC201 на число митохондриальных нуклеоидов в клетке и средний размер митохондрий в культуре клеток рака молочной железы человека линии BT474. Показано, что инкубация клеток BT474 в течение 24 ч с ONC201 (10 мкМ) снижает количество нуклеоидов с 262 ± 46 до 140 ± 27 на клетку, а увеличение длительности инкубации до 48 ч сопровождается снижением количества митохондриальных нуклеоидов до 67 ± 22 на клетку. Обнаружено, что ONC201-индуцированное изменение числа нуклеоидов на клетку зависело от длительности присутствия агента в среде инкубации. Кратковременное (24 ч) и долговременное (48 ч) воздействия на клетки однократной дозы ONC201 приводили к обратимому и/или необратимому изменению количества нуклеоидов на клетку. Так, после 24 ч обработки и последующей инкубации клеток в свободной от ONC201 среде (отмывка) в течение 120 ч, наблюдалось восстановление количества нуклеоидов до 211 ± 47 на клетку. Напротив, 120-часовая отмывка клеток, после 48 ч обработки, не приводила к восстановлению количества нуклеоидов, и их количество оставалось на уровне 70 ± 59 на клетку. Изменение количества митохондриальных нуклеоидов, независимо от длительности обработки клеток препаратом ONC201, положительно коррелирует с изменением среднего размера митохондрий как показателя их морфологии. Заключается, что ONC201 оказывает цитостатическое действие на клетки BT474 в культуре, подавляет пролиферацию клеток, индуцирует зависимое от длительности обработки обратимое или необратимое уменьшение числа митохондриальных нуклеоидов и фрагментацию митохондрий.

Ключевые слова: конфокальная флуоресцентная микроскопия, культура клеток BT474, ONC201, фрагментация митохондрий, митохондриальные нуклеоиды, митохондриальная ДНК, анализ изображений

ONC201 является перспективным экспериментальным противоопухолевым препаратом из класса имипридонов [1], который в настоящее время проходит многочисленные клинические испытания в США [1, 2]. Единственная на сегодняшний день мишень ONC201 была определена как митохондриальная казеинолитическая протеаза Р (ClpP) [2–4]. Однако, несмотря на успешные результаты клинических исследований, механизм действия ONC201 на клетки млекопитающих до конца не выявлен [3–5]. На сегодняшний день достоверно известно, что фармакологические препараты (в особенности противовирусные и хемотерапевтические) способны индуцировать митохондриальную дисфункцию через уменьшение

количества mtДНК [6]. Наряду с описанными в литературе данными о цитотоксическом действии ONC201 на некоторые клеточные линии [1, 3–5] имеются также результаты исследований, которые указывают на то, что противоопухолевые свойства ONC201, возможно, обусловлены его цитостатическим действием [3]. Недавно было показано, что препарат вызывает значительные изменения в структуре митохондрий, нарушение их морфологии со сдвигом в сторону фрагментации, ингибирование митохондриального дыхания и приводит к потере mtДНК [4, 5]. Из более чем 1500 митохондриальных белков только 13 кодируются mtДНК, являющихся функциональными субъединицами комплексов окислительного фос-

форилирования [7, 8]. Эти 13 ключевых субъединиц необходимы для поддержания нормального функционирования митохондрий: синтеза внутриклеточной АТФ, участия в поддержании Ca^{2+} -гомеостаза клеток, метаболизма нуклеотидов, липидов, аминокислот, коферментов и генерации активных форм кислорода, и нарушение содержания этих белков в митохондриях сопровождается тяжкими патологиями [9–12]. Несмотря на то, что внутриклеточная мишень противоопухолевого агента ONC201 выявлена как митохондриальная казеинолитическая протеаза (ClpP) – фермент, непосредственно вовлеченный в систему контроля качества митохондриальных белков [3–5] – механизм ONC201-индукции нарушения митохондриальных функций в клетках млекопитающих остается невыясненным [4, 13].

Демонстрация нарушений в структуре митохондрий и изменения содержания mtДНК в опухолевых клетках под действием этого агента указывает на ключевую роль митохондрий и mtДНК в механизме адаптации клеток к стрессовым воздействиям [4, 14, 15]. Анализ имеющихся в литературе данных указывает на то, что ONC201-индукционная фрагментация митохондрий и уменьшение содержания mtДНК в культтивируемых опухолевых клетках зависят от режима обработки клеток и данные, полученные после 12–24-часовой обработки клеток, отличаются от данных, представленных в работах, в которых клетки подвергались воздействию этого препарата в течение 72 ч и более [5, 16, 17]. Основываясь на этих наблюдениях, мы предположили, что реакция клеток на внешний стресс (10 мкМ ONC201) зависит от длительности обработки клеток препаратом и, по всей видимости, является двухэтапной, т.е. *кратковременная* обработка клеток этим препаратом с последующей отмыvkой будет принципиально отличаться от *долговременной* обработки. Для проверки этого предположения и определения временной зависимости действия препарата ONC201 на клетки BT474 (рак молочной железы человека) по динамике изменения содержания нуклеоидов (отражающих содержание mtДНК) и среднего размера митохондрий (степени фрагментации) под действием ONC201 в настоящей работе мы выбрали метод количественной конфокальной флуоресцентной микроскопии [14, 18, 19]. Мы показали, что однократная и *кратковременная* (24 ч) обработка клеток BT474 препаратом ONC201 (10 мкМ) в культуре сопровождается фрагментацией митохондрий и уменьшением количества нуклеоидов на клетку. Однако последующая инкубация клеток в течение 120 ч в свежей среде инкубации, не содержащей препарата, приводила к частичному восстановлению морфологии митохондрий и исходного числа нуклеоидов на клетку. Совершенно другая картина наблюдалась

после однократной, но более *длительной* (48 ч) обработки клеток 10 мкМ ONC201, последующая инкубация клеток в течение 120 ч в свежей среде, не содержащей препарата, сопровождалась необратимым уменьшением числа нуклеоидов и среднего размера митохондрий. Необходимо отметить, что в обоих случаях, независимо от длительности обработки клеток BT474 препаратом ONC201, наблюдалось подавление пролиферации клеток без индукции клеточной гибели. Выявленная зависимость действия препарата ONC201 на число нуклеоидов и морфологию митохондрий в клетках BT474 от *длительности* обработки указывает на участие медленных и необратимых изменений в клетках, сопровождающихся их трансформацией и переходом из пролиферирующего состояния в состояние так называемого «клеточного старения». Полученные результаты могут обеспечить основу выяснения деталей молекулярных механизмов, участвующих в адаптационной трансформации клеток рака молочной железы человека под действием противоопухолевого агента ONC201.

Материалы и методы

Клеточная культура. В работе использовали культуру клеток рака молочной железы человека BT474 (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Клетки инкубировали в полной среде DMEM/F12 (50:50, #C420E, #C600п, ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (#F7524, Sigma, Германия), 2 мМ L-глутамина (#Ф032, ПанЭко, Россия), 24 мкг/мл дифлюкана (Pfizer, США), смесь антибиотика и антимикотика (A5955, Sigma, Германия) при 37°C и 5% CO₂.

Обработка клеток BT474 агентом ONC201.

Клетки BT474 высевали на чашки Петри (SPL Life Sciences, Корея) диаметром 35 мм при плотности 5000 клеток/см² в полной среде DMEM/F12 и инкубировали 16–18 ч в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ / 95% воздуха при 37°C и 95% влажности перед добавлением ONC201. Далее среду инкубации заменяли на аналогичную с добавлением ONC201 (SelleckChem, США) в концентрации 10 мкМ. Далее клетки инкубировали в течение 24 или 48 ч в CO₂-инкубаторе. После 24 или 48 ч обработки клеток ONC201, как описано выше, среда инкубации заменялась полной средой DMEM/F12 без добавления ONC201, далее клетки инкубировали в течение 120 ч в инкубаторе с полной заменой среды инкубации каждые 24 ч.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия клеток BT474. Для конфокальной микроскопии клетки, высаженные на чашки Петри, нагружали флуоресцентными красителями, как описано ранее [20, 21], с небольшими модификациями. Для визуализации клеточных ядер был использован Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen, США), ядра кле-

ток и митохондриальные нуклеоиды были помечены с помощью SYBR Green I (S7563, Invitrogen, США), а митохондрии прокрашивались MitoTracker Deep Red 633 (MTDR, M-22426, Molecular Probes, США). Среду инкубации заменили на раствор Хенкса (Р020п, ПанЭко, Россия), содержащий 2 мкг/мл Hoechst 33342, SYBR Green I в разведении 1:200000 и 150 нМ MTDR (M-22426, Molecular Probes, США), клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин в термостате. После окрашивания клетки трижды отмывали раствором Хенкса, не содержащим красителей.

Трехцветные флуоресцентные изображения были получены с использованием сканирующего конфокального флуоресцентного микроскопа Leica TCS SP5 на базе DM6000 CS (Leica Microsystems, Германия) в режиме последовательного сканирования каналов с применением иммерсионного объектива HCX PL APO lambda blue 63×, NA = 1,4 (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции красителя Hoechst 33342 осуществляли с помощью диодного лазера 405 нм, возбуждение SYBR green – линией 488 нм аргонового лазера, а MTDR – линией 633 нм гелий-неонового лазера. Регистрацию флуоресценции Hoechst 33342, SYBR Green I и MTDR производили при длинах волн 440 ± 20 нм, 540 ± 15 нм и 710 ± 25 нм соответственно. Толщина оптического среза составляла 0,773 мкм.

Обработка и анализ изображений клеток BT474 проводились с использованием программы Fiji ImageJ [22]. Для автоматизации процесса получения количественных данных о числе митохондриальных нуклеоидов и размере митохондрий нами был специально разработан макрос, исходный код которого доступен по требованию. Принцип работы макроса представлен на рис. 1.

На первом шаге трехцветное изображение разделяется на 3 канала (8 бит каждый) соответствующие полученному флуоресцентному сигналу от Hoechst 33342 (ядра клеток), SYBR Green I (ядра и митохондриальные нуклеоиды) и MTDR

(митохондрии). Далее следует ряд модификаций отдельных каналов для 1) подсчета количества клеток (по числу ядер); 2) получения «чистого» изображения митохондриальных нуклеоидов в канале SYBR Green I; 3) оценки количества митохондриальных нуклеоидов; 4) оценки среднего размера митохондрий.

При использованных нами протоколах подготовки клеток для флуоресцентной конфокальной микроскопии, SYBR Green I прокрашивает ядра клеток и митохондриальные нуклеоиды, а Hoechst 33342 – только ядра (рис. 2A). Для получения «чистого» изображения нуклеоидов необходимо вычесть сигнал Hoechst 33342 из канала SYBR Green I. Для этого в процессе реализации алгоритма макроса с использованием канала Hoechst 33342 создаются маски ядер в бинарном формате, после предварительного усиления контраста и установки порога бинаризации по методу «Otsu». Далее маска ядер используется как для автоматического подсчета количества ядер (функция «Analyze particles»), так и для вычитания изображения ядер из канала SYBR Green I. Эта операция производится на следующем этапе, результатом чего является изображение, соответствующее флуоресцентному сигналу SYBR Green I только от митохондриальных нуклеоидов. Затем следуют операции по вычитанию фона по алгоритму «Rolling ball», применения фильтров «Unsharp Mask» и «Median», применение метода «Otsu» для бинаризации изображения. В результате получается адаптированное изображение (маска) митохондриальных нуклеоидов, количество которых оценивается функцией «Analyze particles».

На следующем этапе автоматически подсчитывается количество и средний размер митохондрий через анализ канала исходного изображения, соответствующий флуоресценции MTDR. Этот процесс аналогичен обработке данных канала SYBR Green I, за исключением вычитания маски ядер.

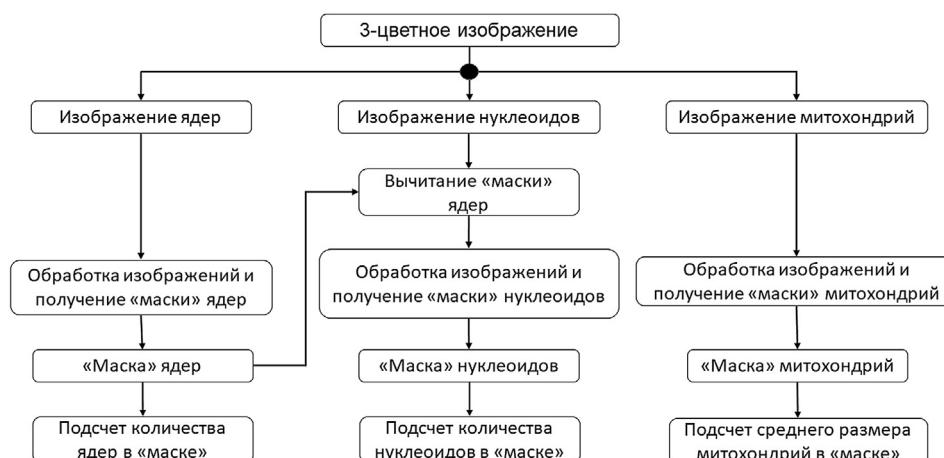


Рис. 1. Схема обработки конфокальных 3-цветных изображений для анализа количества митохондриальных нуклеоидов на клетку и среднего размера митохондрий. Описание алгоритма и деталей в тексте. Разработанный макрос доступен по требованию.

Статистический анализ. Анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel. Для статистического анализа количества нуклеоидов и среднего размера митохондрий использовалась программа GraphPad Prism 9 с применением однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с *post-hoc*-тестом Бонферрони [23]. Для выявления корреляции между изменениями количества нуклеоидов и среднего размера митохондрий рассчитывался коэффициент корреляции Пирсона. Каждый эксперимент проводили не менее 3 раз, и для каждой временной точки (0 ч, 24 ч и 48 ч) было проанализировано не менее 300 клеток, как указано в подписях к рисункам. Результаты количественной оценки числа митохондриальных нуклеоидов в клетках и размера митохондрий представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (Mean ± SD).

Результаты

Изменение числа нуклеоидов. Инкубация клеток рака молочной железы человека BT474 с противораковым препаратом ONC201 сопровождается существенными изменениями морфологии митохондриального ретикулума, а именно – среднего размера митохондрий, а также уменьшением числа нуклеоидов в клетках. Несмотря на то, что эти изменения сопутствуют ответу клеток млекопитающих на внешний стресс [9, 24, 25], мы не обнаружили заметной потери жизнеспособности клеток BT474 и увеличения интенсивности клеточной гибели под действием препарата ONC201. На рис. 2 приведены типичные конфокальные изображения клеток BT474, окрашенных Hoechst

33342 (ядерная ДНК, синяя флуоресценция), SYBR Green I (ядерная и митохондриальная ДНК, зеленая флуоресценция) и MTDR (митохондрии, красная флуоресценция). Видно, что области флуоресцентного сигнала SYBR Green I находятся внутри областей, соответствующих флуоресценции MTDR, что отражает внутримитохондриальную локализацию нуклеоидов (рис. 2A, совмещение). В культивируемых клетках BT474, подверженных действию противоракового препарата ONC201, наблюдаются изменения как содержания митохондриальных нуклеоидов, так и морфологии самих митохондрий, которые зависят от длительности инкубации клеток с этим препаратом. Количественный анализ изображений показал, что число регистрируемых нуклеоидов достоверно уменьшается с 262 ± 46 на клетку в контрольной группе в отсутствие ONC201 (рис. 2Б, белая заливка) до 140 ± 27 на клетку после 24 ч инкубации (рис. 2Б, черная заливка) и до 67 ± 22 на клетку после 48 ч инкубации клеток в присутствии 10 мкМ ONC201 (рис. 2Б, серая заливка).

Изменение среднего размера митохондрий. Наряду с уменьшением числа митохондриальных нуклеоидов наблюдается изменение морфологии митохондриальной сети клеток, что проявляется в фрагментации, т.е. уменьшении количества и размеров тубулярных форм, увеличении числа мелких митохондрий и уменьшении среднего размера митохондрий (рис. 2, красная флуоресценция MTDR). При этом средний размер митохондрий в клетках, инкубированных с ONC201 в течение 24 ч, оцененный по флуоресценции MTDR, уменьшается с $2,96 \pm 0,46$ мкм² в контроле

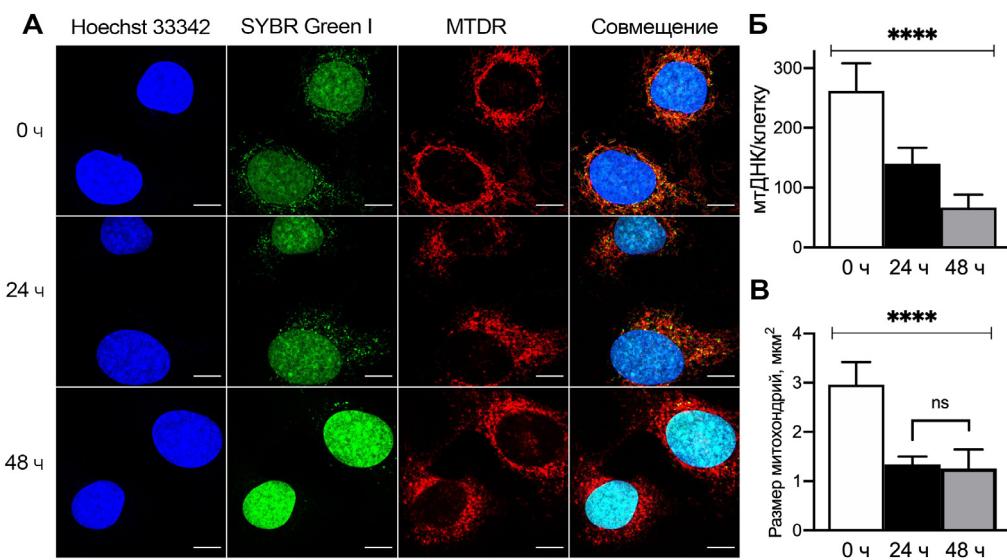


Рис. 2. Действие 10 мкМ ONC201 на число нуклеоидов и морфологию митохондрий в клетках рака молочной железы человека BT474. А. Типичные конфокальные изображения клеток BT474, подвергнутых обработке ONC201 (10 мкМ), шкала в нижнем правом углу изображений равна 10 мкм. Б. Изменение количества нуклеоидов под действием ONC201 во времени. В. Изменение среднего размера митохондрий под действием ONC201 во времени. На графиках приведены средние значения ± стандартные отклонения, полученные в не менее чем трех независимых экспериментах. Для количественного анализа использовано: 381 клетка (0 ч), 316 клеток (24 ч), 604 клетки (24 ч, 5 сут отмычки), 340 клеток (48 ч) и 518 клеток (48 ч, 5 сут отмычки). Для выявления различий использовался однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с *post-hoc*-тестом Бонферрони ($n = 3$, $p < 0,05$). ns – несущественное различие.

(рис. 2В, белая заливка) до $1,34 \pm 0,16 \text{ мкм}^2$ в клетках, инкубированных 24 ч с ONC201 (рис. 2В, черная заливка), с тенденцией к дальнейшему уменьшению среднего размера митохондрий до $1,26 \pm 0,38 \text{ мкм}^2$ при увеличении времени инкубации клеток с ONC201 до 48 ч (рис. 2В, серая заливка).

Таким образом, обработка клеток BT474 противоопухолевым препаратом ONC201 сопровождается значимыми изменениями числа нуклеоидов в клетках и фрагментацией митохондриальной сети. Аналогичные изменения содержания нуклеоидов и среднего размера (морфологии) митохондрий, индуцированные противоопухолевыми препаратами, с различными механизмами действия, наблюдались в экспериментах на ряде клеточных линий [1, 3, 5, 6]. Известно, что препарат ONC201 обладает выраженным цитостатическим действием [2]. Возникает естественный вопрос, являются ли обратимыми наблюдаемые нами изменения.

Обратимость действия ONC201 на число нуклеоидов и фрагментацию митохондрий в клетках BT474. Для ответа на поставленный вопрос нами была выбрана экспериментальная клеточная модель, в которой число нуклеоидов и средний размер митохондрий непосредственно после инкубации клеток с 10 мкМ препарата ONC201 (в течение 24 ч или 48 ч) сравнивались с данными, полученными через 120 ч после отмычки клеток от ONC201 с регулярной (каждые 24 ч) заменой среды инкубации на свежую, не содержащую препарат.

Удаление препарата ONC201 из среды инкубации после 24 ч обработки приводило к обратимым изменениям – среднее количество нуклеоидов в клетках возросло с 140 ± 27 до 211 ± 47 на клетку (рис. 3А, 24 ч обработки, штрих-заливка). Однако обработка клеток ONC201 в течение 48 ч приводила к необратимым изменениям: после обработки число нуклеоидов уменьшилось с 262 ± 46

до 67 ± 22 на клетку, но после 120-часовой отмычки осталось на уровне 70 ± 59 на клетку (рис. 3А, 48 ч обработки, штрих-заливка).

Отмывка клеток BT474 от ONC201 в течение 120 ч со сменой среды инкубации каждые 24 ч на свежую среду, не содержащую препарат, сопровождалась частичным восстановлением исходной морфологии митохондрий (среднего размера), которое зависело от длительности первичной обработки клеток препаратом. Так, после 24 ч инкубации клеток BT474 с 10 мкМ ONC201 митохондрии претерпевали фрагментацию и средний размер митохондрий изменялся от $2,97 \pm 0,46 \text{ мкм}^2$ в контроле (рис. 3Б, 24 ч обработки, белая заливка) до $1,34 \pm 0,16 \text{ мкм}^2$ в клетках, обработанных ONC201 (рис. 3Б, 24 ч обработки, черная заливка). При 120-часовой отмычке клеток от препарата после 24 ч инкубации с ONC201 средний размер митохондрий был $2,08 \pm 0,31 \text{ мкм}^2$, что составляет около 70% от значения в контрольной группе (рис. 3Б, 24 ч обработки, штрих-заливка). Однако средний размер митохондрий в клетках, обработанных ONC201 в течение 48 ч, после 120-часовой отмычки клеток не восстанавливался, а продолжал уменьшаться, достигая величины $0,88 \pm 0,18 \text{ мкм}^2$ (рис. 3Б, 48 ч обработки, штрих-заливка).

Обсуждение

В настоящей работе исследована временная зависимость действия противоопухолевого препарата ONC201 на изменение числа митохондриальных нуклеоидов и средний размер митохондрий в культуре клеток рака молочной железы человека BT474. Известно, что химиотерапевтические агенты в условиях *in vitro* способны вызывать в том числе и значительные изменения в структуре митохондриальной сети, сопровождающиеся нарушениями морфологии митохондрий со сдвигом в сторону

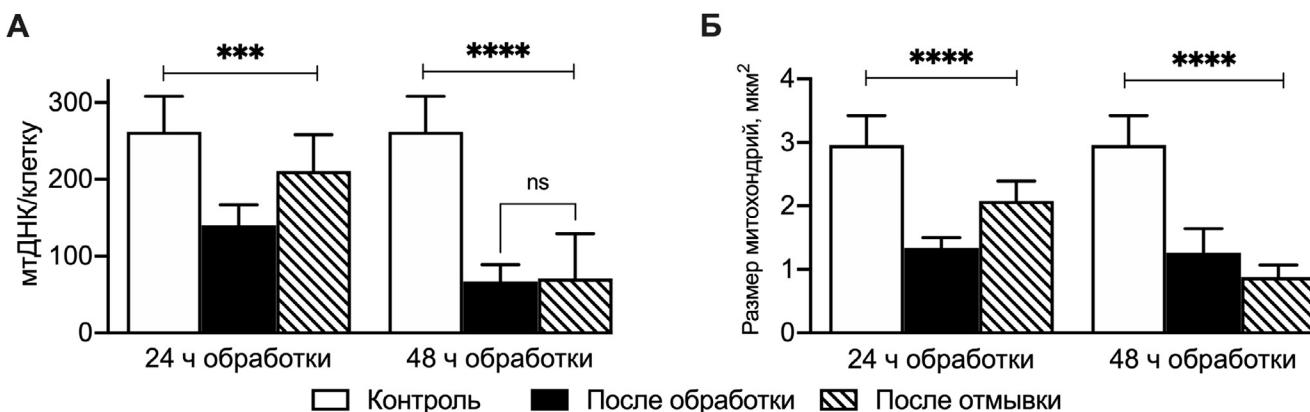


Рис. 3. Обратимость изменений морфологии митохондрий и количества нуклеоидов в клетках BT474 после отмычки ONC201. А. Количество нуклеоидов на клетку до обработки (белая заливка), после обработки ONC201 (черная заливка) и после 120 ч отмычки (штрих-заливка) для 24-часовой (левая группа) и 48-часовой обработки ONC201 (правая группа). Б. средний размер митохондрий до обработки (белая заливка), после обработки ONC201 (черная заливка) и после 120 ч отмычки (штрих-заливка) для 24-часовой (левая группа) и 48-часовой обработки ONC201 (правая группа). На графиках приведены средние значения \pm стандартные отклонения, полученные в не менее чем трех независимых экспериментах. Для количественного анализа использовано: 381 клетка (0 ч), 316 клеток (24 ч), 604 клетки (24 ч, 5 сут отмычки), 340 клеток (48 ч) и 518 клеток (48 ч, 5 сут отмычки). Для выявления различий использовался однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с post-hoc-тестом Бонферрони ($n = 3$, $p < 0,05$).

фрагментации, ингибированием митохондриального дыхания и потерей mtДНК [4, 5, 26, 27]. Отличительной особенностью действия ONC201 является то, что максимальный эффект однократного воздействия препаратом ONC201, оцениваемый по содержанию mtДНК проявляется не сразу, а зависит от длительности обработки клеток и указывает на развитие действия препарата во времени [5, 15, 16, 28, 29]. В настоящей работе мы сравнили влияние 24- и 48-часовой инкубации клеток с 10 мКМ ONC201 на количество митохондриальных нуклеоидов и средний размер митохондрий в культуре клеток BT474. Также мы предприняли попытку оценить обратимость действия препарата на указанные параметры клеток через 120 ч после отмычки клеток от ONC201. Мы показали, что под действием ONC201 количество нуклеоидов на клетку и средний размер митохондрий могут изменяться как обратимо, так и необратимо – в зависимости от длительности предварительной обработки клеток этим агентом. Так 120-часовая отмычка клеток от агента после 24 ч обработки ONC201 сопровождается восстановлением количества нуклеоидов, в то время как после 48 ч обработки ONC201 такая отмычка не приводит к восстановлению количества нуклеоидов (рис. 2), что указывает на сложную динамику влияния ONC201 на митохондриальную сеть. Сходные результаты были получены и при измерении среднего размера митохондрий в клетках (рис. 3А и 3Б, 24 ч обработки). Интересно отметить наличие положительной корреляции между числом нуклеоидов и морфологией митохондрий – с уменьшением числа нуклеоидов митохондрии претерпевают фрагментацию. При этом коэффициент корреляции Пирсона (r) для числа нуклеоидов и среднего размера митохондрий

составил 0,69 в случае с 24-часовой обработкой ONC201 и 0,84 – для эксперимента с 48-часовой обработкой.

Таким образом, методом анализа цифровых конфокальных флуоресцентных изображений с применением специально разработанного макроса в настоящей работе показано, что однократная обработка клеток BT474 препаратом ONC201, в зависимости от длительности обработки, приводит как к обратимому, так и к необратимому снижению числа нуклеоидов, фрагментации митохондрий и подавлению пролиферации клеток в обоих случаях, причем без индукции клеточной гибели. Полученные результаты являются отправной точкой для дальнейшего исследования причин дестабилизирующего действия противоопухолевого препарата на морфологию внутриклеточных митохондрий и число митохондриальных нуклеоидов, выявления молекулярных механизмов, ответственных за обратимое и необратимое изменение морфологии митохондрий и числа нуклеоидов, а также оценки связи между числом нуклеоидов и адаптационной трансформацией клеток BT474 рака молочной железы человека под действием противоопухолевого агента ONC201.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20-145, Э.Л.Х.). А.А.М. выражает благодарность коллективу Лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН за поддержку при выполнении этой работы. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allen J.E., Kline C.L., Prabhu V.V., et al. Discovery and clinical introduction of first-in-class imipridone ONC201 // Oncotarget. 2016. Vol. 7. N 45. P. 74380–74392.
- Arrillaga-Romany I., Chi A.S., Allen J.E., Oster W., Wen P.Y., Batchelor T.T. A phase 2 study of the first imipridone ONC201, a selective DRD2 antagonist for oncology, administered every three weeks in recurrent glioblastoma // Oncotarget. 2017. Vol. 8. N 45. P. 79298–79304.
- Graves P.R., Aponte-Collazo L.J., Fennell E.M. J., et al. Mitochondrial protease ClpP is a target for the anticancer compounds ONC201 and related analogues // ACS Chem. Biol. 2019. Vol. 14. N 5. P. 1020–1029.
- Ishizawa J., Zarabi S.F., Davis R.E., et al. Mitochondrial ClpP-mediated proteolysis induces selective cancer cell lethality // Cancer Cell. 2019. Vol. 35. N 5. P. 721–737.
- Greer Y.E., Porat-Shliom N., Nagashima K., et al. ONC201 kills breast cancer cells in vitro by targeting mitochondria // Oncotarget. 2018. Vol. 9. N 26. P. 18454–18479.
- Stoker M.L., Newport E., Hulit J.C., West A.P., Morten K.J. Impact of pharmacological agents on mitochondrial function: a growing opportunity? // Biochem. Soc. Trans. 2019. Vol. 47. N 6. P. 1757–1772.
- Taanman J.W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication // Biochim. Biophys. Acta 1999. Vol. 1410. N 2. P. 103–123.
- Calvo S.E., Mootha V.K. The mitochondrial proteome and human disease // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2010. Vol. 11. P. 25–44.
- Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. Cell biology. Metabolic control of cell death // Science. 2014. Vol. 345. N 6203: 1250256.
- Porporato P. E., Filigheddu N., Pedro J.M.B., Kroemer G., Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer // Cell Res. 2018. Vol. 28. N 3. P. 265–280.
- Fontana G.A., Gahlon H.L. Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation // Nucleic Acids Res. 2020. Vol. 48. N 20. P. 11244–11258.

12. La Morgia C., Maresca A., Caporali L., Valentino M.L., Carelli V. Mitochondrial diseases in adults // J. Intern. Med. 2020. Vol. 287. N 6. P. 592–608.
13. Ralff M.D., Jhaveri A., Ray J.E., Zhou L., Lev A., Campbell K.S., Dicker D.T., Ross E.A., El-Deiry W.S. TRAIL receptor agonists convert the response of breast cancer cells to ONC201 from anti-proliferative to apoptotic // Oncotarget. 2020. Vol. 11. N 42. P. 3753–3769.
14. McArthur K., Whitehead L.W., Heddleston J.M., et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis // Science. 2018. Vol. 359. N 6378: eaao6047.
15. Pruss M., Dwucet A., Tanriover M., Hlavac M., Kast, R.E., Debatin K.M., Wirtz C.R., Halatsch M.E., Siegelin M.D., Westhoff M.A., Karpel-Massler G. Dual metabolic reprogramming by ONC201/TIC10 and 2-Deoxyglucose induces energy depletion and synergistic anti-cancer activity in glioblastoma // Br. J. Cancer. 2020. Vol. 122. N 8. P. 1146–1157.
16. Kline C.L., Van den Heuvel A.P., Allen J.E., Prabhu V.V., Dicker D.T., El-Deiry, W.S. ONC201 kills solid tumor cells by triggering an integrated stress response dependent on ATF4 activation by specific eIF2alpha kinases // Sci. Signal. 2016. Vol. 9. N 415: ra18.
17. Geiss C., Witzler C., Poschet G., Ruf W., Regnier-Vigouroux A. Metabolic and inflammatory reprogramming of macrophages by ONC201 translates in a pro-inflammatory environment even in presence of glioblastoma cells // Eur. J. Immunol. 2021. Vol. 51. N 5. P. 1246–1261.
18. Kukat C., Wurm C.A., Spähr H., Falkenberg M., Larsson N.G., Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011. Vol. 108. N 33. P. 13534–13539.
19. Bonekamp N.A., Larsson N.G. SnapShot: Mitochondrial nucleoid // Cell. 2018. Vol. 172. N 1–2. P. 388–388.e1.
20. Sasaki T., Sato Y., Higashiyama T., Sasaki N. Live imaging reveals the dynamics and regulation of mitochondrial nucleoids during the cell cycle in Fucci2-HeLa cells // Sci. Rep. 2017. Vol. 7: e11257.
21. Leonard A.P., Cameron, R.B., Speiser J.L., Wolf B.J., Peterson Y.K., Schnellmann R.G., Beeson C.C., Rohrer B. Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1853. N 2. P. 348–360.
22. 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.
23. Armstrong R.A. When to use the Bonferroni correction // Ophthalmic Physiol. Opt. 2014. Vol. 34. N 5. P. 502–508.
24. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death // Nat. Cell Biol. 2014. Vol. 16. N 8. P. 728–736.
25. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J. M., Kepp O., Kroemer G. Regulated cell death and adaptive stress responses // Cell Mol. Life Sci. 2016. Vol. 73. N 11–12. P. 2405–2410.
26. Gallage, S., Gil J. Mitochondrial Dysfunction Meets Senescence // Trends Biochem. Sci. 2016. Vol. 41. N 3. P. 207–209.
27. Vasileiou P.V.S., Evangelou K., Vlasis K., Fildisis G., Panayiotidis M.I., Chronopoulos, E., Passias P.G., Kouloukoussa M., Gorgoulis V.G., Havaki S. Mitochondrial homeostasis and cellular senescence // Cells. 2019. Vol. 8. N 7: 686.
28. Prabhu V.V., Morrow S., Rahman Kawakibi A., et al. ONC201 and imipridones: Anti-cancer compounds with clinical efficacy // Neoplasia. 2020. Vol. 22. N 12. P. 725–744.
29. Ishizawa J., Kojima K., Chachad D., et al. ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-independent apoptosis in hematological malignancies // Sci. Signal. 2016. Vol. 9. N 415: ra17.

Поступила в редакцию 15.03.2021 г.

После доработки 13.04.2021 г.

Принята в печать 21.06.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Effect of ONC201 antitumor drug on the number of mitochondrial nucleoids in BT474 breast cancer cells in culture

A.A. Mishukov¹ , A.V. Berezhnov² , M.I. Kobyakova³ , Ya.V. Evstratova³ , E.Yu. Mndlyan³ , E.L. Holmuhamedov^{3,*} 

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

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, 3 Institutskaya st., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia;

³Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,

3 Institutskaya st., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

*e-mail: ekhs@mail.com

The effect of the cytostatic antitumor drug ONC201 on the number of mitochondrial nucleoids and the average size of mitochondria in the BT474 human breast cancer cells was studied. It was shown that incubation of BT474 cells with ONC201 (10 μ M) for 24 h reduces the number

of nucleoids from 262 ± 46 to 140 ± 27 per cell, and in cells incubated with drug for 48 h the number of mitochondrial nucleoids was further reduced to 67 ± 22 per cell. It was found that the ONC201-induced change in the number of nucleoids per cell depends on the duration of treatment. Short-term (24 h) and long-term (48 h) exposure of cells to a single dose of ONC201 led to a *reversible* and *irreversible* change in the number of nucleoids per cell, respectively. Thus, after 24 h of exposure and subsequent 120 h washout with ONC201-free medium, the number of nucleoids was restored to 211 ± 47 per cell, while 120-hour washout of drug after 48 hours of treatment did not lead to the restoration of the number of nucleoids, and their number remained at the level of 70 ± 59 per cell. Changes in the number of mitochondrial nucleoids, regardless of the duration of cell treatment with ONC201, positively correlated with changes in the average size of mitochondria as an indicator of their morphology. It is concluded that ONC201 has a cytostatic effect on BT474 cells in culture, suppresses cell proliferation and induces a reversible or irreversible decrease in the number of mitochondrial nucleoids and fragmentation of mitochondria, depending on the duration of treatment.

Keywords: *confocal fluorescence microscopy, cell culture BT474, ONC201, fragmentation of mitochondria, mitochondrial nucleoids, mitochondrial DNA, image analysis*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-75-20-145.

Сведения об авторах

Мишуров Артем Алексеевич – студент биотехнологического факультета МГУ. Тел.: 8-496-773-94-20; e-mail: artem.mishukov1999@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5464-7868>

Бережнов Алексей Валерьевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки РАН. Тел.: 8-496-773-91-25; e-mail: g_56@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0271-6179>

Кобякова Маргарита Игоревна – аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-94-20; e-mail: ritaaaaaa49@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6846-9994>

Евстратова Яна Владимировна – аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-94-20; e-mail: yannaevstratova@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2044-8510>

Мндлян Екатерина Юрьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-94-20; e-mail: mndlyaneyu@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1823-828X>

Холмухамедов Эхсон Лукманович – докт. биол. наук, гл. науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-9420; e-mail: ekhson@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0809-350X>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.73

Анализ продолжительности жизни человека в исторической перспективе

А.И. Михальский^{1,*} , В.Н. Анисимов² , Г.М. Жаринов³

¹*Институт проблем управления имени В.А. Трапезникова, Российской академии наук,
Россия, 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 65;*

²*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова,
Россия, 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68;*

³*Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова,
Россия, 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70*

**e-mail: ipuran@yandex.ru*

Рассматривается проблема корректной интерпретации данных о среднем возрасте смерти людей в различные исторические периоды на основании информации, представленной в Википедии и включенной в базу данных «Личности Энциклопедии». Отмечается специфика таких данных, связанная с цензурированием и характером их сбора, приводящим к селективности. Предложен подход, учитывающий эти обстоятельства, что позволяет уточнять получаемые закономерности о продолжительности жизни и расширить исторический диапазон исследования.

Ключевые слова: продолжительность жизни, средний возраст смерти, Википедия, база данных «Личности Энциклопедии», цензурирование, селективность, вероятность дожития

Исторический тренд продолжительности жизни человека вызывает пристальный интерес научных различных специальностей, поскольку на основании этого тренда можно судить о факторах, способствующих долголетию, об эффективности социально-экономических мер по улучшению жизни людей, о влиянии прогресса в медицине. В опубликованных ранее работах [1, 2] на основании данных о странах, имевших наивысшую продолжительность жизни в конкретный исторический период, показан ее неуклонный рост, начиная с середины XIX в. При этом подчеркивается, что ни одна из существующих демографических теорий не предсказывала такого явления, делая ошибочные заключения о «видовом пределе» продолжительности жизни человека [2].

Развитие средств извлечения и хранения информации привело к накоплению больших массивов данных и, в частности, данных о продолжительности жизни человека в различные исторические эпохи. Такая информация концентрировано содержится в различных энциклопедических справочниках, информационных ресурсах, разных разделах Википедии. В отличие от обезличенных статистических данных эти ресурсы позволяют получить персонифицированную информацию, содержащую даты жизни, род занятий, агрегированные причины смерти. Использование такой информации позволяет выделять дополнительные факторы, порой неожиданные, влияю-

щие на продолжительность жизни [3–5], однако обоснованность подобных заключений требует использования методов анализа и сопоставления, учитывающих особенности сбора данных.

В демографии важной характеристикой состояния населения является продолжительность жизни. Эта характеристика отражает влияние на здоровье населения состояния окружающей среды, уровня медицинского обслуживания, социально-экономической ситуации. Различают ожидаемую продолжительность жизни (ОПЖ) при рождении, которую вычисляют по интенсивности смертности, рассчитанной по агрегированным данным о числе смертей в различных возрастных группах, и средний возраст смерти (СВС), который можно вычислить, сопоставляя даты рождения и смерти конкретных людей.

ОПЖ при рождении вычисляется на основании, демографических данных населения по формуле [6]:

$$e_0 = \frac{1}{l_0} \sum_{x=0}^{\omega-1} L_x, \quad (1)$$

где L_x – численность живущих в возрастном интервале от « x » до « $x+1$ »; e_0 – ОПЖ при рождении; l_0 – число родившихся; $\omega-1$ – предельный возраст, до которого доживает последний человек из поколения родившихся. Показатель ОПЖ имеет смысл теоретического среднего значения продол-

жительности жизни, рассматриваемой как случайная величина, распределение которой задается величинами интенсивности смертности в различных возрастных группах для людей одного года рождения — когорте рождения. Требование использовать когортные данные является существенным ограничением при вычислении ОПЖ, так как при этом необходима информация о числе рождений и смертей как минимум за 100 предыдущих лет. Подобная информация доступна лишь в редких случаях — например, для Швеции [7].

На практике для вычисления ОПЖ используют не реальные когортные данные, а данные для членов «синтетической когорты», составленной из лиц, рожденных в разные годы. Расчет ОПЖ при рождении производится по формуле:

$$e_0 = \sum_{k=0}^{\infty} \prod_{x=0}^k (1 - q_x), \quad (2)$$

где q_x — доля умерших за год среди лиц возраста x на начало года, k — номер одногодичной возрастной группы. Значения q_x берутся из таблиц смертности [6]. Рассчитанная таким образом оценка ОПЖ близка к величине ОПЖ, рассчитанной по когортным данным, если интенсивность смертности зависит только от возраста, но в каждой возрастной группе постоянна во времени. Такое население называют стабильным и часто используют в теоретических рассмотрениях в демографии. В реальности влияние времени на интенсивность смертности в возрастных группах существенно — оно может как увеличиваться, так и уменьшаться. Для учета совокупного влияния возраста и времени используют математические демографические модели [8], которые позволяют учесть влияние времени на интенсивность смертности, но доля субъективизма в выборе модели этого влияния остается.

СВС при рождении $E_0(y)$ в группе из N человек, рожденных в году y , является эмпирической оценкой ОПЖ при рождении и вычисляется по формуле:

$$E_0(y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N t_i, \quad (3)$$

где t_i — возраст смерти i -го человека. СВС получается в результате прямых вычислений без использования предварительных допущений о характере распределения возраста смерти. В то же время эта характеристика не учитывает наличие еще живых на данный момент лиц, занижая реальный СВС, который получился бы, если учесть возраст смерти в будущем. При исследовании временных трендов СВС вычисляют для групп лиц одного года рождения, и полученная оценка характеризует когорту рождения. ОПЖ и СВС могут рассчитываться и для лиц, уже достигших возраста x . Тогда говорят

про ОПЖ и СВС в возрасте x . При этом в формулах (1–3) рассматриваются лишь такие люди.

Нами собрана база данных из Википедии и других энциклопедических источников, содержащая более 700 тыс. записей дат рождения и смерти, охватывающая период рождения от I века н.э. до настоящего времени. Понятно, что информация, внесенная в энциклопедические источники, подвергается селекции, отражая не все население, а наиболее выдающихся людей. Тем не менее, большой объем данных позволяет учесть подобные искажения и извлечь полезную информацию об исторических трендах в продолжительности жизни, а также о влиянии на продолжительность жизни широкого круга профессиональных занятий. Статья посвящена обсуждению методологии учета специфики данных, собранных из энциклопедических источников, обсуждению полученных результатов и их сопоставлению с опубликованными данными об исторических трендах в продолжительности жизни людей [1].

Материалы и методы

База данных «Личности Энциклопедии». Наиболее надежными источниками данных о продолжительности жизни являются результаты переписи населения, данные различных регистров [9, 10], результаты специальных долгосрочных обследований [11]. Для обработки и интерпретации таких данных разработаны специальные методы, учитывающие специфику сбора данных (регистрация по обращаемости, опрос, инструментальные наблюдения и т. п.), особенности населения (возрастной, этнический состав, социально-экономические различия), а также цели исследования. Недавно появились демографические базы, содержащие предобработанные данные по фертильности и продолжительности жизни человека почти во всех странах мира (HFD. <http://www.humanfertility.org>, HMD. <http://www.mortality.org>).

В отличие от специализированных баз данных, формируемых под руководством специалистов, запущенная в январе 2001 г. Википедия является самым крупным и наиболее популярным в настоящее время справочником в Интернете, основанном на принципе свободного сбора документированного материала. Существует ряд правил, которым должны удовлетворять публикуемые документы. За соблюдением этих правил следят редакторы Википедии. По объему сведений и тематическому охвату Википедия считается самой полной энциклопедией из когда-либо создавшихся за всю историю человечества. На май 2018 г. Википедия содержала более 40 млн статей. Интернет-сайт Википедии является пятым по посещаемости сайтом в мире и широко используется в качестве справочника.

В рамках Википедии стали доступны сведения обо всех сколько-нибудь значимых личностях.

В 2008 г. нами был начат систематический сбор информации, содержащейся в Википедии, в 2019 г. база данных «Личности Энциклопедии» была зарегистрирована в Реестре баз данных Ростспатента. Объем базы ежегодно увеличивался на 60–100 тыс. человек и на момент написания этой статьи составлял более 726 тыс. персоналий.

За прошедшие годы с помощью материалов базы «Личности Энциклопедии» был опубликован ряд статей, в которых мы исследовали продолжительность жизни и некоторые причины смерти представителей различных, преимущественно творческих, профессий и ученых, включенных в Википедию [3, 4, 12–16].

Увеличивающийся с каждым годом объем базы позволяет выявлять новые, не всегда очевидные и ожидаемые, закономерности. Одновременно с этим неизбежно встает вопрос о том, насколько корректно материалы Википедии отражают настоящие демографические процессы. Данная статья является попыткой ответить на этот вопрос.

Специфика данных по продолжительности жизни, содержащихся в исторической базе «Личности Энциклопедии». Данные, собранные в базе данных, охватывают широкий исторический период от I века н. э. до настоящего времени. В силу особенностей процедур появления информации в Википедии данные по продолжительности жизни подвержены искажениям, которые необходимо учитывать при их интерпретации. На рис. 1 представлены значения СВС мужчин, рожденных с 1850 по 2000 гг. и занесенных в базу данных.

На рисунке выделяются два периода – с 1850 по 1924 гг. и с 1925 по 2000 гг. В первом периоде СВС держится на уровне 68 лет и, начиная с 1899 г., увеличивается до 77 лет. Начиная с 1925 г., СВС по данным из базы неуклонно снижается до 40 лет к 1970 г., опускаясь до 17 лет в 2000 г. Такое падение СВС очевидно не отражает демографические тенденции и связано со спецификой данных, представленных в исторической базе «Личности Энциклопедии».

Если оставить в стороне вопрос о точности сообщенных в энциклопедических изданиях дат рождения и смерти, то при интерпретации результатов анализа собранных данных следует учитывать наличие двух существенных ограничений: цензурирования и селекции данных. Цензурирование возникает в случае, если дата смерти человека неизвестна. В настоящем исследовании лица с неуказанный датой смерти, но рожденные в XX в., рассматриваются как случаи цензурирования на дату последней ревизии исторической базы данных. Лица, рожденные до XX в., дата смерти которых неизвестна, исключались из анализа. Селекция данных является следствием того, что в энциклопедию вносятся сведению не о случайно выбранных из населения людях, а о в каком-то

смысле выдающихся личностях. Учет указанных обстоятельств необходим для корректной интерпретации данных, собранных в базе «Личности Энциклопедии».

В ряде случаев удается учесть и нивелировать влияние селекции на оценку продолжительности жизни. Примером служит изучение продолжительности жизни нобелевских лауреатов [17]. Анализ показывает, что лауреаты живут дольше, чем население страны, в которой они проживают. Это объясняется тем, что поскольку Нобелевскую премию присуждают за открытия, сделанные в возрасте 30–40 лет, а то и позже, то все лауреаты дожили до достаточно зрелого возраста совершения открытия, до которого не доживает часть прочего населения. Отсюда становится ясно, что сравнивать надо не ОПЖ при рождении, а ОПЖ в возрасте совершения открытия. Сравнение дожития нобелевских лауреатов с дожитием населения США, представителями которого являются многие лауреаты, не выявило статистически значимых различий [17].

Подобное обстоятельство учитывалось в исследовании Е.М. Андреева и Д.А. Жданова продолжительности жизни российских академиков (<http://www.demoscope.ru/weekly/2007/0283/tema03.php>). Оказалось, что ОПЖ в возрасте 50 лет членов Российской академии наук и мужчин России в 1901–1930 гг. статистически не различались, но ОПЖ членов Российской академии наук и мужчин Швеции различались очень сильно. Затем следует провал в ОПЖ академиков и мужчин России, а с 1970 по 2007 гг. ОПЖ в возрасте 50 лет членов Российской академии статистически не отличается от ОПЖ мужчин в том же возрасте, но уже не в России, а в Швеции.

Для корректной интерпретации данных из базы «Личности Энциклопедии» о продолжительности жизни важно учесть механизм селекции – выбора персоналий, включаемых в базу данных. Относительно этого механизма можно строить различные гипотезы. Мы предполагаем, что человек должен, как минимум, дожить до некоторого возраста, чтобы быть включенным в Википедию. В дальнейшем будем считать этот возраст равным 20 годам. Существование более сложных правил, связанных, возможно, с историческими социально-экономическими трендами и профессиональными предпочтениями, учесть не представляется возможным из-за отсутствия соответствующей информации.

Учет цензурирования. Для учета наличия цензурирования при расчете дожития применяется непараметрическая оценка вероятности дожития – множительная оценка кривой смертности Каплана–Майера, вычисляемая по формуле [18]:

$$S(t_j) = \prod_{i=1}^j \left(1 - \frac{d_i}{r_i}\right), \quad (4)$$

где t_0, t_1, \dots, t_j – последовательность лет, для которых вычисляются значения вероятности дожития до времени t_j (функции дожития); r_i – число людей, доживших до года t_i ; d_i – число людей, умерших между годами t_{i-1} и t_i . Особенностью формулы (4) является то, что убыль людей между годами t_{i-1} и t_i складывается из числа умерших за этот период людей d_i и числа цензурированных людей, выбывших из наблюдения.

Для получения оценки ОПЖ при наличии цензурирования в математической демографии используется величина математического ожидания продолжительности жизни, равная площади под кривой дожития — доли людей, проживших дольше текущего возраста. Кривую дожития строят, используя непараметрическую оценку Каплана–Майера, рассчитанную по имеющимся данным с учетом цензурирования.

Учет влияния селекции данных по продолжительности жизни, включенных в базу «Личности Энциклопедии». Прежде всего, интересно провести сравнение СВС лиц, включенных в базу данных, с ОПЖ при рождении, рассчитанной демографами. В [1] приведены исторические данные о средней продолжительности жизни в странах, в которых на текущий год она была максимальна. Показано, что ОПЖ при рождении среди мужчин в упомянутых странах, начиная с 1840 г., монотонно растет, увеличиваясь за год на три месяца. Тенденция роста ОПЖ для лиц, рожденных после 1925 г., сохраняется, но СВС, рассчитанный по данным базы «Личности Энциклопедии», монотонно снижается с уровня 75 лет в 1925 г. до 17 лет в 2000 г., а в странах–рекордсменах ОПЖ в 2000 г. достигает уровня 77,8 лет. Похожая картина наблюдается и при анализе данных по продолжительности жизни женщин. Строго говоря, сравнение СВС, рассчитанного по базе «Личности Энциклопедии», с ОПЖ в странах–рекордсменах некорректно, поскольку СВС рассчитывается для когорт – людей одного года рождения, а ОПЖ вычисляется путем создания синтетической когорты. Однако на качественном уровне такое сравнение кажется допустимым.

Возможный механизм селекции и цензурирования данных, занесенных в Википедию, можно сформулировать в виде двух необходимых условий:

1) человек должен быть взрослым – достигнуть возраста 20 лет;

2) человек должен умереть до даты последнего обновления базы.

Условие 2 подкрепляется тем фактом, что из 149119 человек, родившихся после 1925 г. и занесенных в историческую базу «Личности Энциклопедии» до 13 марта 2020 г. (момент последнего обновления) живыми оказались только 5949 человек, а умерли 143170.

СВС, рассчитанный по формуле (3), является случайной величиной, математическое ожидание

которой для лиц, рожденных в году y и умерших в возрасте между a_0 и a_1 , задается формулой:

$$E_{a_0, a_1}(y) = \frac{(a_0 + e_{a_0}) \times S_y(a_0) - (a_1 + e_{a_1}) \times S_y(a_1)}{S_y(a_0) - S_y(a_1)}, \quad (5)$$

где $S_y(a_0)$ и $S_y(a_1)$ – значения вероятности дожития до возраста a_0 и a_1 при рождении в году y соответственно; e_{a_0} и e_{a_1} – значения ОПЖ в возрасте a_0 и a_1 соответственно при рождении в году y . Заменив в формуле (5) математическое ожидание СВС его эмпирической оценкой $E_y(y)$, вычисленной по формуле (3), можно с учетом механизма селекции, описанного выше, по данным из базы «Личности Энциклопедии», рассчитать ОПЖ при рождении для лиц, рожденных в году y :

$$E_{sel}(y) = \frac{(S_y(a_0) - S_y(a_1)) \times E_y(y) + (a_1 + e_{a_1}) \times S_y(a_1)}{S_y(a_0)}, \quad (6)$$

где $E_y(y)$ – величина СВС при наличии механизма селекции среди людей, родившихся в году y ; $S_y(a)$ – вероятность дожития до возраста a при рождении в году y .

Справедливость формулы (6) проверялась в ходе «компьютерного эксперимента» по данным о продолжительности жизни мужчин в Швейцарии, содержащимся в базе данных по смертности человека HMD. Цель эксперимента заключалась в проверке того, что по когортным данным о среднем возрасте смерти для людей, доживших до 20 лет (предполагаемое необходимое условие включения в Википедию), по формуле (6) можно рассчитать ОПЖ при рождении. Швейцария была выбрана, поскольку для этой страны в HMD наиболее полно представлены данные за период рождения с 1925 по 2000 гг. Данные имеют вид набора «period life tables» – таблиц смертности, в которых данные по смертности, ОПЖ в различных возрастных группах берутся из когорт различных годов рождения. Кроме того, Швейцария не участвовала в изучаемый период в войнах и, по нашему мнению, имеющиеся данные в малой степени подвержены искажениям. По данным HMD вычислялась ОПЖ в возрасте 20 лет в зависимости от года рождения для лиц, рожденных в интервале 1925–2000 гг. и удовлетворяющих условиям включения в Википедию: прожить 20 лет и умереть до 2000 г. Последнее условие означает, что полученное значение ОПЖ совпадает с теоретическим значением наблюдаемого СВС $E_y(y)$. Результаты вычисления получившейся зависимости $E_y(y)$ от года рождения представлены на рис. 2 светлыми квадратами. Виден эффект снижения СВС во времени, аналогичный наблюдаемому на рис. 1 для данных из базы «Личности Энциклопедии».

Для применения формулы (6) необходимо задать вероятность $S_y(a)$ дожития до возраста a при рождении в году y , а также значения ОПЖ e_a

в возрасте a . Значения вероятности $S_y(a)$ брались из таблиц смертности последовательно изменяя год рождения у начиная с 1925 г. Поскольку предполагается, что в Википедию включаются в основном люди старше 20 лет, то при вычислениях рассматривались значения a не ниже этого возраста и, таким образом, исключалось влияние изменений в детской смертности. Аналогично бралась из таблиц величина ОПЖ в возрасте $a - e_a$. Восстановленные значения СВС с учетом селекции

для лиц, рожденных в 1925 г., показаны на рис. 2 крестиками. Там же черными кружками показаны значения ОПЖ при рождении для мужчин, вычисленные непосредственно по данным продолжительности жизни мужчин в Швейцарии, рожденных в интервале 1925–2000 гг., но без условия смерти до 2000 г. На рис. 2 видно совпадение рассчитанных по формуле (6) значений СВС со значениями ОПЖ при рождении, рассчитанными по демографическим данным.

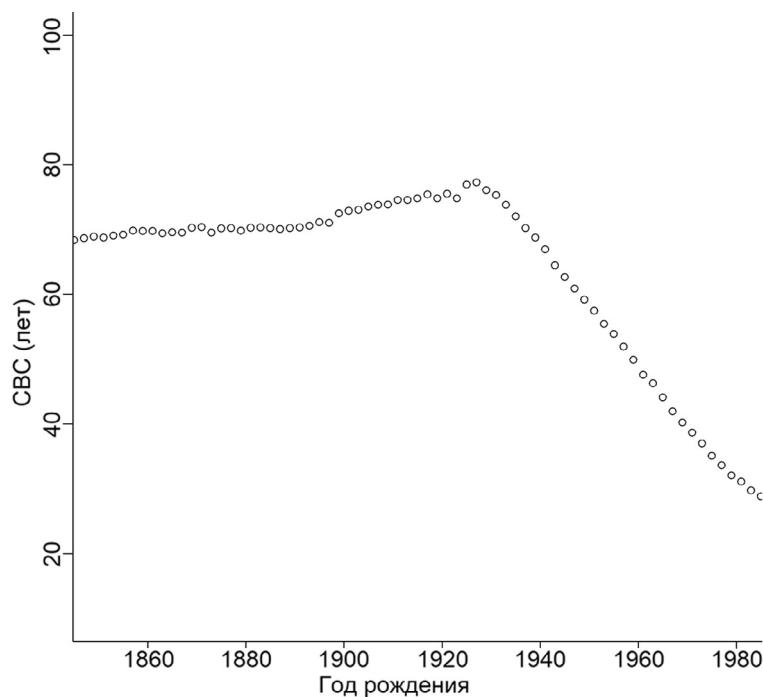


Рис. 1. СВС мужчин по данным из исторической базы «Личности Энциклопедии».

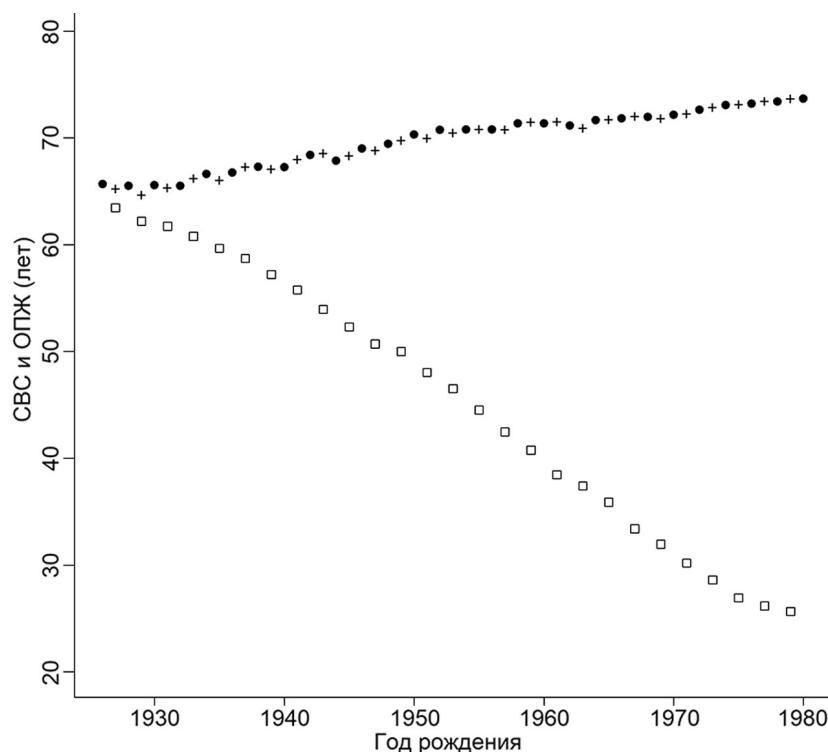


Рис. 2. ОПЖ при рождении мужчин в Швейцарии (темные кружки), СВС мужчин в Швейцарии после селекции по условиям, предполагаемым в статье, (светлые квадраты), восстановленные по формуле (6) значения ОПЖ при рождении (+).

Результаты и обсуждение

Учет селекции. Формулу (6) применили к данным из исторической базы «Личности Энциклопедии» для лиц, рожденных после 1924 г. Светлые символы на рис. 3 показывают результаты расчета СВС для лиц, родившихся с 1850 по 2000 гг. Крестиками показаны результаты расчета с учетом селекции по формуле (6) ОПЖ при рождении после 1924 г. При расчетах в качестве функции дожития использовали оценку функции дожития Каплана—Майера, построенную по записям базы для когорты лиц, рожденных в 1925 г. Люди, дожившие до 2010 г., считались цензурированными в возрасте 85 лет. Таким образом, предполагая, что для лиц, упомянутых в Википедии и рожденных после 1925 г., характер дожития будет такой же, как и в когорте 1925 г. рождения, получили прогноз ОПЖ при рождении, учитывающий селективный характер данных Википедии о СВС. Достоверность этого прогноза можно будет проверить, когда в Википедии появятся более полные данные о дате смерти лиц, рожденных в период 1925—2010 гг. Наши вычисления, скорее всего, дают нижнюю границу ОПЖ, поскольку используют характеристики дожития в когорте 1925 г. рождения, игнорируя существующий тренд к увеличению продолжительности жизни.

Сопоставление СВС и ОПЖ. Приведенные в статье формулы позволяют оценить, насколько СВС отличается от ОПЖ при рождении. Если механизм селекции отсутствует, то при вычислении СВС принимаются во внимание все рожденные люди, то есть $a_0=0$, а $S_y(a_0)=1$. Возраст a_1 можно положить равным максимальному, вероятность

дожития до которого $S_y(a_1)$ равна нулю. Формула (5) преобразуется в выражение:

$$E_0(y) = e_0,$$

то есть различия между СВС и ОПЖ при рождении нет.

Если вычисление СВС проводится только среди людей, доживших до возраста a_0 , как при селекции данных Википедии, то формула (5) принимает вид:

$$E_{a_0}(y) = a_0 + e_{a_0}.$$

В этом выражении величина $a_0 + e_{a_0}$ равна ОПЖ при рождении для людей, доживших до возраста a_0 . Таким образом, СВС, вычисленный по данным Википедии, превосходит ОПЖ при рождении всего населения не более чем на 20 лет. Причем можно предположить, что порог селекции по возрасту a_0 тем выше, чем дальше в историю мы углубляемся и различие между СВС и ОПЖ при рождении всего населения увеличивается.

Интересно сравнить с этой точки зрения оценки СВС, построенные по данным исторической базы «Личности Энциклопедии», и ОПЖ при рождении в различные годы в странах-рекордсменах [1]. Разница между СВС и ОПЖ изменяется от примерно 25 лет в 1850 г. до примерно 15 лет в 1920 г. Это, возможно, является результатом снижения детской смертности, ведущим к росту ОПЖ при рождении. СВС, рассчитанный по данным базы «Личности Энциклопедии», нечувствителен к этому явлению, поскольку вычисляется на основании данных жизни людей, переживших детский возраст.

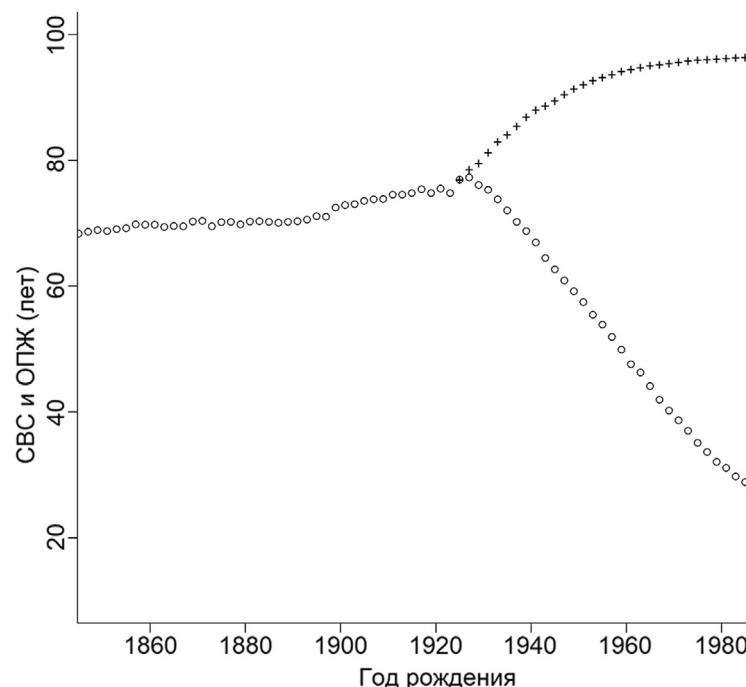


Рис. 3. СВС мужчин по данным из исторической базы «Личности Энциклопедии» (светлые символы), восстановленные по формуле (6) значения ОПЖ при рождении мужчин, рожденных после 1924 г. (+).

Мы рассмотрели проблему применимости данных Википедии, представленных в базе «Личности Энциклопедии», при оценке исторических трендов продолжительности жизни. Поскольку данные в Википедии не являются результатом случайного выбора из фиксированного населения, то при изучении динамики изменения продолжительности жизни необходимо учитывать наличие цензурирования и селекции. В ранее опубликованной работе [19] авторы поднимают вопрос о необходимости учета указанных недостатков данных из Википедии и демонстрируют результат такого учета. В настоящей статье даны подробные рекомендации и приведены формулы для такого учета, применимые при анализе любых демографических, социологических, экономических данных о длительности событий, подверженных селекции и цензурированию. Существенной особенностью приведенных в статье формул является необходимость использования оценок вероятности дожития именно в изучае-

мых группах людей — женщин, мужчин, лиц одинаковых профессий и т.д. Точность таких оценок резко снижается с уменьшением численности группы. С другой стороны, увеличение численности группы ведет к возрастанию гетерогенности данных. При оценке вероятности дожития возможны допущения — например, о малости влияния временного фактора на возрастную зависимость дожития, а также возможно использование рассчитанных демографических характеристик из, например, базы данных по смертности человека HMD.

Авторы выражают глубокую признательность программисту А.С. Чиркову, создавшему систему извлечения и обработки информации, без которой выполнение этой работы было бы невозможным. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oeppen J., Vaupel J.W. Broken limits to life expectancy // Science. 2002. Vol. 296. N 5570. P. 1029–1031.
2. Vaupel J.W., Carey J.R., Christensen K., Johnson T.E., Yashin A.I., Holm N.V., Iachine I.A., Kannisto V., Khazaeli A.A., Liedo P., Longo V.D., Zeng Y., Manton K.G., Curtsinger J.W. Biodemographic trajectories of longevity // Science. 1998. Vol. 280. N 5365. P. 855–860.
3. Zharinov G.M., Anisimov V.N. Lifespan, longevity, and incidence of violent death in writers and poets// Adv. Gerontol. 2016. Vol. 6. N 4. P. 265–271.
4. Zharinov G.M., Anisimov V.N. Music and longevity // Adv. Gerontol. 2014. Vol. 4. N 4. P. 283–289.
5. Kenny D.T., Asher A. Life expectancy and cause of death in popular musicians: is the popular musician lifestyle the road to ruin? // Med. Probl. Perform. Ar. 2016. Vol. 31. N 1. P. 37–44.
6. Thomas R.K. Concepts, methods and practical applications in applied demography. Cham: Springer, 2018. 333 pp.
7. Yashin A.I., Begun A.S., Boiko S.I., Ukrainstseva S.V., Oeppen J. New age patterns of survival improvement in Sweden: do they characterize changes in individual aging? // Mech. Ageing Dev. 2002. Vol. 123. N 6. P. 637–647.
8. Lee R.D., Carter L.R. Modeling and forecasting U. S. mortality // J. Am. Stat. Assoc. 1992. Vol. 87. N 419. P. 659–671.
9. Вальков М.Ю., Карпунов А.А., Коулман М.П., Аллемани К., Панкратьева А.Ю., Потехина Е.Ф., Валькова Л.Е., Гржизбовский А.М. Популяционный раковый регистр как ресурс для науки и практического здравоохранения // Экол. чел. 2017. № 5. С. 54–62.
10. Kyvik K.O., Christensen K., Skytthe A., Harvald B., Holm N.V. The Danish twin register // Dan. Med. Bull. 1996. Vol. 43. N 5. P. 467–470.
11. Kagan A., Dawber T.R., Kannel W.B., Revotskie N. The Framingham study: a prospective study of coronary heart disease // Fed. Proc. 1962. Vol. 21. N 4. Pt. 2. P. 52–57.
12. Anisimov V.N., Zharinov G.M. Life span and longevity in representatives of creative professions // Adv. Gerontol. 2014. Vol. 4. N 1. P. 83–94.
13. Zharinov G.M., Mikhalsky A.I., Neklasova N.Y., Anisimov V.N. Longevity and some causes of death in musicians of the 20th Century// Adv. Gerontol. 2020. Vol. 10. N 2. P. 193–203.
14. Анисимов В.Н., Жаринов Г.М. Продолжительность жизни ученых различных специальностей // Природа. 2014. № 5. С. 51–52.
15. Anisimov V.N., Zharinov G.M. Mean age of death and longevity for male scientists of different specialties // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 4. P. 193–198.
16. Anisimov V.N., Zharinov G.M. Mean age of death, longevity and incidence of violent death among various elite sportsmen categories // J. Geront. Geriat. Res. 2017. Vol. 6: 6.
17. Анисимов В.Н., Михальский А.И. Стареет ли Нобелевский лауреат? Математический анализ возраста и продолжительности жизни лауреатов Нобелевской премии за 1901–2003 гг. // Усп. геронтол. 2004. № 15. С. 14–22.
18. Cox D.R., Oakes D. Analysis of survival data. N.Y.: Chapman and Hall, 1984. 212 pp.
19. Michalski A.I., Zharinov G.M., Anisimov V.N. Capacities and limitations of the use of data from Wikipedia for analysis of human life expectancy // Adv. Gerontol. 2021. Vol. 11. N 1. P. 1–7.

Поступила в редакцию 20.04.2021 г.

После доработки 20.06.2021 г.

Принята в печать 12.07.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Analysis of human life span through history

A.I. Mikhalski^{1,*} , V.N. Anisimov² , G.M. Zharinov³ 

¹V.A. Trapeznikov Institute of Control Sciences, Russian Academy of Sciences,
65 Profsoyuznaya st., Moscow, 117997, Russia;

²N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology,
68 Leningradskaya st., Pesochny, Saint Petersburg, 197758, Russia;

³A.M. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies,
70 Leningradskaya st., Pesochny, St. Petersburg, 197758, Russia

*e-mail: ipuran@yandex.ru

The problem of correct interpretation of data on the mean age of death of people in different historical periods based on information presented in Wikipedia and included in the “Personalities of the Encyclopedia” database is considered. The specificity of these data, associated with censoring and the nature of their collection, leading to selectivity, is noted. An approach is proposed that takes into account these circumstances, which makes it possible to clarify the obtained patterns of life expectancy and expand the historical range of research.

Keywords: *life span, mean age at death, Wikipedia, “Personalities of the Encyclopedia”, censoring, selectivity, survival probability*

Funding: The research was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russian Federation.

Сведения об авторах

Михальский Анатолий Иванович – докт. биол. наук, ст. науч. сотр., гл. науч. сотр. Института проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН. Тел.: 8-495-198-17-20; e-mail: ipuran@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1998-1315>

Анисимов Владимир Николаевич – чл.-корр. РАН, докт. мед. наук, проф., зав. научным отделом канцерогенеза и онкогеронтологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им Н.Н. Петрова Минздрава России. Тел.: 8-812-439-95-34; e-mail: aging@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3683-861X>

Жаринов Геннадий Михайлович – докт. мед. наук, проф., гл. науч. сотр. отдела лучевых и комбинированных методов лечения Российского научного центра радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова. Тел.: 8-812-439-66-44; e-mail: asatur15@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6034-2040>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 616-092.19+57.017.3

Активность антиоксидантной системы при беременности в норме и при гипоксии

**А.В. Граф^{1,3} , А.А. Байжуманов² , М.В. Маслова¹, Я.В. Крушинская¹,
А.С. Маклакова¹, Н.А. Соколова¹, А.А. Каменский^{1,*}**

¹*Кафедры физиологии человека и животных и ²кафедра биофизики, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*

³*Институт нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий,
Московский физико-технический институт, Россия, 123098, г. Москва, ул. Максимова, д. 4*

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

Беременность у млекопитающих характеризуется увеличением базального потребления кислорода, с ее развитием происходит усиление окислительного стресса (ОС), а при беременности, осложненной гипоксическим стрессом, увеличивается окислительное повреждение. ОС в период внутриутробного развития является одним из ключевых факторов патогенеза большинства нарушений беременности, в том числе преждевременных родов и преэклампсии. Растущая потребность в кислороде, с одной стороны, увеличивает продукцию активных форм кислорода, а с другой – усиливает синтез компонентов антиоксидантной защиты (АОЗ). Для оценки активности системы АОЗ у самок крыс определяли содержание небелковых тиолов в крови и гомогенате печени, каталазную активность в гомогенате печени, супероксиддисмутазную активность в плазме крови и гомогенате печени, общую антиоксидантную активность плазмы крови, а также оценивали интенсивность перекисного окисления липидов в плазме крови и гомогенате печени. По ряду параметров показано снижение активности системы АОЗ в плазме крови и печени самок именно в предродовом периоде нормальной беременности и, в особенности, беременности, осложненной гипоксическим стрессом. Можно предположить, что изменения показателей АОЗ в крови отражают изменения не только в организме матери, но и в плаценте, а значит, могут представлять потенциальную опасность для развивающегося плода.

Ключевые слова: прооксидантная система, антиоксидантная система, окислительный стресс, беременность, активные продукты тиобарбитуровой кислоты, супероксиддисмутаза

Беременность характеризуется динамическими изменениями во многих системах организма, что приводит к увеличению базального потребления кислорода: растет уровень обмена веществ, изменяется соотношение энергетических субстратов, используемых различными системами организма, увеличиваются частота сердечных сокращений и минутный объем сердца, усиливаются маточное и почечное кровообращение [1]. Беременность, предъявляя более высокие энергетические требования организму, делает его более уязвимым в ситуациях, требующих мобилизации жизненных сил, в частности – при защите от окислительного стресса (ОС), который вовлечен во многие репродуктивные расстройства и нарушения беременности, от субфертильности до выкидыша, сосудистых заболеваний матери и преждевременных родов [2]. Многие исследования показали, что во время беременности усиливается ОС, а при беременности, осложненной такими состояниями как гипоксический стресс и пре-

эклампсия, увеличивается окислительное повреждение [3]. Причины увеличения риска ОС у матери во время беременности неизвестны; тем не менее, накопленные данные свидетельствуют о том, что важную роль в этом играет плацента и риск увеличивается с течением беременности, так как растущая плацента очень сильно васкуляризована, потребляет много кислорода и содержит множество митохондрий, что способствует росту образования активных форм кислорода (АФК), который пропорционален уровню напряжения кислорода [1, 4–6]. При этом важно учитывать, что окислительные процессы при беременности, особенно на ранних сроках, выполняют фундаментальную регулирующую функцию, так как кислород является одним из регуляторных факторов, влияющих на пролиферацию цитотрофобластов в первый триместр беременности. Так как кровоснабжение плаценты в этот период еще минимально, то формирование плаценты происходит в условиях гипоксии. В клетках млекопитаю-

ющих гипоксия стимулирует экспрессию кислород-регулируемых белков стресса, белков теплового шока, цитокинов и факторов роста, включая эритропоэтин, эндотелин, IL-1, IL-8 и т. д. Последующее увеличение потребности в кислороде увеличивает продукцию АФК, а также синтез компонентов антиоксидантной защиты (АОЗ) [7]. Проблемы возникают, когда происходит дисбаланс между прооксидантами и антиоксидантами, либо из-за чрезмерного образования прооксидантов, либо из-за снижения активности антиоксидантной системы, что приводит к недостаточной восстановительной способности антиоксидантов. Обычно это происходит, если концентрация кислорода изменяется слишком быстро, как правило, вследствие различных заболеваний матери, общим компонентом которых является гипоксия, ведущая к нарушению маточно-плацентарного кровообращения и являющаяся основной причиной возникновения гипоксии плода и новорожденных [8].

В настоящее время имеется разрозненная информация относительно исходных уровней ОС и АОЗ у женщин с неосложненной беременностью. Поскольку ОС может играть как физиологическую, так и патологическую роль в развитии и исходе беременности, целью нашего исследования было охарактеризовать профили АОЗ здоровых самок в разные периоды беременности, а также сравнить уровень АОЗ при нормальной беременности и на фоне гипоксического стресса. Изменение активности АОЗ в течение нормальной беременности и беременности, отягощенной гипоксическим стрессом, имеет не только фундаментальное, но и клиническое значение: применение антиоксидантов при ряде нарушений беременности вместо ожидаемого улучшения состояния оказывается в лучшем случае бесполезным, а порой и вредным, повышая риск неблагоприятного исхода беременности [9, 10].

Материалы и методы

Эксперименты на животных. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованным Директивами Европейского Союза 86/609 / EEC и 2010/63 / EU. Животных содержали при $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности $53 \pm 5\%$ с циклом 12/12 ч свет / темнота (свет 9:00 = ZT 0, свет выключен 21:00 = ZT 12).

В эксперименте использовали самок крыс линии Вистар, беременных ($n = 32$) и небеременных ($n = 22$), массой около 250–300 г. Для получения беременных крыс двух самок помещали в клетку с одним самцом. Через 24 ч проводили анализ вагинального мазка. Первые сутки беременности отсчитывали от момента обнаружения в мазке сперматозоидов.

Использовали шесть групп крыс-самок: (1) небеременные контрольные – К(НБ); (2) небеременные, подвергавшиеся воздействию острой гипобарической гипоксии (ОГГ) – ОГГ(НБ); (3) контрольные на 11-е сут беременности – К(Б11); (4) самки на 11-е сут беременности, подвергавшиеся воздействию гипоксии накануне – ОГГ(Б11), данный срок беременности у крыс соответствует первому триместру беременности человека, когда происходит органогенез; (5) контрольные на 21-е сут беременности – К(Б21); (6) самки на 21-е сут беременности, подвергавшиеся воздействию гипоксии накануне – ОГГ(Б21), данный срок беременности у крыс соответствует третьему триместру беременности человека и относится к предродовому периоду [11–13]. Количество животных в каждой экспериментальной группе указано в подрисуночных подписях.

Анализ полученных результатов проводился по трем направлениям: 1) сравнение контрольных группы между собой – К(НБ), К(Б11), К(Б21) (верхний ряд графиков на рисунках); 2) сравнение контрольных и опытных групп – К(НБ) и ОГГ(НБ), К(Б11) и ОГГ(Б11), К(Б21) и ОГГ(Б21) (верхние и нижние графики); 3) сравнение опытных групп между собой – ОГГ(НБ), ОГГ(Б11), ОГГ(Б21) (нижний ряд графиков на рисунках).

Моделирование ОГГ. Самок крыс подвергали ОГГ в декомпрессионной камере объемом 3,3 л путем снижения атмосферного давления с помощью вакуумного насоса «Mez Mohelnice» (Чехия) за 1 мин до 145 мм рт. ст., что соответствует высоте 11500 м (5% O_2), по стандартной методике [14]. Во время моделирования гипоксии у самок крыс регистрировали время от момента окончания снижения давления до остановки дыхания. Среднее время пребывания крыс в условиях гипоксии составило: для группы ОГГ(НБ) – $153,4 \pm 42,6$ с, для группы ОГГ(Б11) – $169,6 \pm 53,8$ с, для группы ОГГ(Б21) – $148,3 \pm 23,9$ с. Достоверных различий по данному показателю между группами не наблюдалось.

Оценка состояния системы АОЗ. Основными антиоксидантными белками в плазме крови, которые участвуют в детоксикации супероксидных анион-радикалов, являются внеклеточная Су, Zn-супероксиддисмутаза (СОД3) и церулоплазмин. Снижение активности СОД3 и количества церулоплазмина в плазме крови способствует окислительным процессам в крови, влияя на физико-химические свойства эритроцитов и функциональное состояние гемоглобина, что может привести к гипоксии. Пероксид водорода, образующийся при дисмутации супероксидного анион-радикала, нейтрализуется глутатионпероксидазой и каталазой системами. В этих реакциях участвуют восстановленный глутатион, который составляет основную часть пула небелковых

тиолов, и каталаза. Общая антиоксидантная активность (ОАА) плазмы крови определяется количеством низкомолекулярных антиоксидантов, в основном – уратов. Уровень веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), определяется в основном конечными продуктами перекисного окисления липидов и используется в качестве маркера ОС.

Определяли содержание небелковых тиолов в крови и гомогенате печени, каталазную активность в гомогенате печени, СОД3 в плазме крови и общую активность супероксиддисмутазы (СОД) в гомогенате печени, ОАА плазмы крови, а также оценивали интенсивность перекисного окисления липидов в плазме крови и гомогенате печени. Для этого через 24 ч после моделирования гипоксии животных декапитировали, брали кровь (для измерения небелковых тиолов и выделения плазмы) и печень (для получения гомогената).

Получение крови и плазмы крови. Забор проб крови проводили во время декапитации животных. Цельную кровь (с добавленным гепарином, 10 ед./мл) центрифугировали 10 мин при 2000 об./мин и 4°C (центрифуга Heraeus Labofuge 400R, Thermo Fisher Scientific, США). Плазму отбирали для измерения активности СОД3, количества церулоплазмина, ОАА плазмы, общего количества белка, количества ТБК-активных продуктов (ТБК-АП).

Получение 10%-ного гомогената печени. Цельный кусок органа (массой до 250 мг) помещали в раствор калий-fosфатного буфера (0,015 М, pH = 7,8) в соотношении 1:9 и гомогенизировали (гомогенизатор SilentCrusherS, Heidolph, Германия) при 4°C. В полученном гомогенате измеряли СОД и каталазную активности, общее количество белка, количество небелковых тиолов и ТБК-АП.

Определение СОД3 и СОД. Супероксиддисмутазную активность определяли в плазме крови (СОД3) и в гомогенате печени (СОД). Метод основан на способности биологических образцов подавлять автоокисление адреналина в щелочном буфере, измерение активности проводили при 25°C. Одна единица активности СОД3 и СОД определяется как ингибирование скорости окисления адреналина на 50%. Изменение поглощения измеряли при 485 нм. Активность выражали в усл. ед./мг белка [15].

Определение каталазной активности в гомогенате печени. Принцип метода основан на том, что каталаза разрушает H₂O₂. Измеряют уменьшение оптической плотности образца при 240 нм. Одна единица каталазной активности равна количеству фермента, необходимого для переработки 1 мкромоля H₂O₂ в минуту при 37°C. Количество израсходованной H₂O₂/мин вычисляли с учетом коэффициента экстинкции – 46,3 M⁻¹cm⁻¹. Активность фермента выражали в единицах каталаз-

ной активности на мг общего белка в минуту (кУ/г белка).

Определение количества церулоплазмина. Количество церулоплазмина определяли по оксидазной активности белка, используя в качестве субстрата окисления ортофенилендиамин (MP Biomedicals, США), окрашенный продукт реакции измеряли при 492 нм. Концентрацию церулоплазмина, выраженную в мкг/мл, определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов церулоплазмина.

Определение количества небелковых тиолов в крови и гомогенате печени. Метод основан на реакции SH-группировок с реагентом Эллмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)) с образованием окрашенного продукта. Определение оптической плотности проводили при длине волны 412 нм, концентрацию рассчитывали с учетом разведения, молярного коэффициента экстинкции 136000 M⁻¹cm⁻¹ и пересчитывали на гемоглобин (в крови) или общий белок (в гомогенате печени), выражали в нмоль/мг Гб и нмоль/мг белка соответственно.

Определение ОАА плазмы крови. Метод основан на способности антиоксидантов плазмы крови, в основном уратов, участвовать в образовании комплекса восстановленного железа с 2,4,6-три-пиридилтриазином с максимумом поглощения при длине волны 593 нм. ОАА определяли по калибровочной прямой с использованием известных концентраций восстановленного железа и выражали в мкмолях Fe²⁺/л плазмы [16].

Определение количества ТБК-АП в плазме крови и гомогенате печени. ТБК-АП появляются в результате взаимодействия конечных продуктов перекисного окисления липидов с 2-тиобарбитуровой кислотой, что позволяет определять их концентрацию по поглощению при 532 нм. Содержание ТБК-АП в крови определяли с учетом разведений и коэффициента молярной экстинкции комплекса малонового диальдегида с ТБК, 0,156 M⁻¹cm⁻¹. Полученные данные выражали в нмоль/мл плазмы или нмоль/мг белка в гомогенате печени [17].

Определение общего количества белка в плазме крови и гомогенате печени. Для определения содержания белка в плазме крови и гомогенате печени использовали модифицированный метод Лоури для определения небольших количеств белка в биологическом материале с использованием реагтива Фолина-Чокальтеу, оптическую плотность измеряли при 650 нм. Концентрацию белка, выраженную в мг/мл, определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов альбумина [17].

Определение уровня гемоглобина в гемолизате крови. При взаимодействии гемоглобина с раствором додецилсульфата натрия происходит его превращение в окисленную низкоспиновую форму –

гемихром, имеющую красноватый цвет, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе. Оптическую плотность раствора измеряли при 540 нм. Количество гемоглобина рассчитывали с учетом разведения и молярного коэффициента экстинкции гемихрома при 540 нм $10,16 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [16].

Статистика. Значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPad Prism, версия 7.0 (GraphPad Software Inc., США). Сравнения между несколькими экспериментальными группами проводили с использованием однофакторный дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с post-hoc тестом Тьюки. Парное сравнение между соответствующими группами, не подвергшимися и подвергшимися воздействию гипоксии, проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Результаты

Анализ состояния системы АОЗ крови у небеременных и беременных крыс на разных сроках беременности в норме и при гипоксическом стрессе. Как показано на рис. 1, в разные сроки беременности наблюдаются заметные изменения в показателях, характеризующих состояние системы АОЗ. В наибольшей степени изменяется уровень СОДЗ в крови беременных: в период органогенеза наблюдается значимое увеличение данного показателя на 30,7% по сравнению с небеременными и, напротив, его снижение в предродовой период на 39,8% относительно раннего срока беременности. Изменения ОАА выражены только в предродовой

период: достоверное снижение относительно небеременных крыс и раннего срока беременности – на 44,1% и 44,9% соответственно. Снижение ОАА и уровня СОДЗ в предродовой период происходит на фоне увеличения содержания ТБК-АП (на 42,5% относительно раннего срока беременности), что отражает усиление ОС на фоне снижения активности системы АОЗ.

Через сутки после гипоксического воздействия, на 11-е и на 21-е сут беременности, наблюдали увеличение уровня небелковых тиолов по сравнению с контрольными крысами того же срока беременности на 11,3% и 23,1% соответственно, а на 21-е сут беременности – также снижение активности церулоплазмина и уровня ТБК-АП на 13,6% и 22,3% соответственно.

При беременности, отягощенной гипоксическим воздействием, к концу беременности изменяется большинство показателей, характеризующих состояние системы АОЗ (рис. 1). Так, в предродовой период у самок крыс ниже уровень СОДЗ (на 23,4% относительно небеременных и на 30,9% относительно раннего срока беременности), ОАА (на 39,0% относительно небеременных и на 34,9% относительно раннего срока беременности) и церулоплазмина (на 14,8% относительно небеременных). При этом уровень небелковых тиолов у них повышен по сравнению с небеременными на 23,7%.

Анализ состояния системы АОЗ печени у небеременных и беременных самок на разных сроках беременности в норме и при гипоксическом стрессе. Изменения параметров АОЗ и ОС в печени у самок контрольных групп во время беременности также наиболее выражены в предродовой период: по

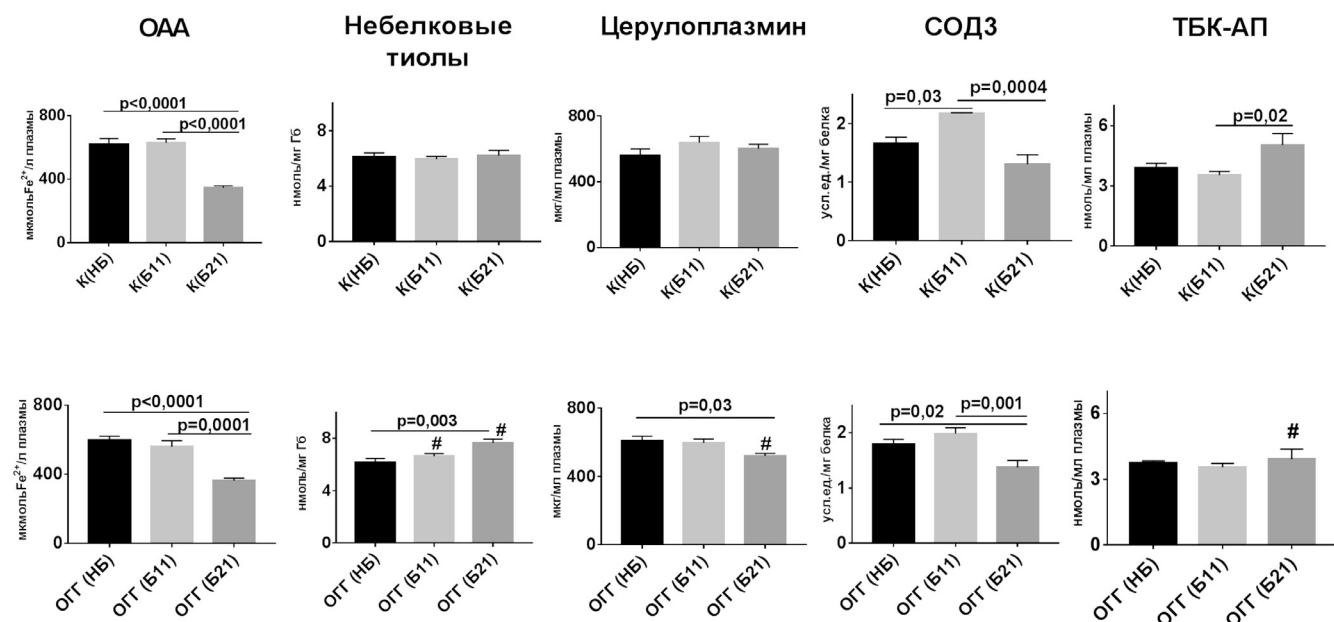


Рис. 1. Показатели ОС и АОЗ крови у небеременных и беременных самок в норме и при гипоксическом стрессе.

Условные обозначения: НБ – небеременные; Б – беременные; К – контроль; ОГГ – острая гипобарическая гипоксия.

– значимые различия между соответствующими группами контрольных животных и животных, подвергшихся воздействию ОГГ. Размеры выборок: К(НБ) = 8; ОГГ(НБ) = 14; К(Б1) = 8; ОГГ(Б1) = 8; К(Б2) = 8; ОГГ(Б2) = 8.

сравнению с небеременными крысами и самками в период органогенеза у них снижена каталазная активность (на 31,4% и 36,4% соответственно) и активность СОД (на 28,9% и 43,2% соответственно). При этом, в отличие от крови, в печени продукция ТБК-АП понижена (на 36,5% относительно небеременных самок и на 35,1% относительно самок на 11-е сут беременности) (рис. 2).

Через сутки после гипоксического воздействия значимые изменения активности АОЗ печени наблюдали только у самок, находящихся на раннем сроке беременности: снижение активности СОД на 31,4% и уровня небелковых тиолов на 7,0%.

При этом после воздействия гипоксии в предродовом периоде наблюдали выраженные отличия активности АОЗ: снижение каталазной активности по сравнению с каталазной активностью у небеременных самок и самок на 11-е сут беременности на 27,4% и 32,0% соответственно, а также активности СОД на 30,8% по сравнению с этим показателем у небеременных самок. Кроме того, в печени самок крыс и на раннем, и на позднем сроках беременности по сравнению с небеременными значительно снизился уровень ТБК-АП на 11,6% и 38,6% соответственно (рис. 2).

Обсуждение

ОС во время беременности традиционно рассматривается как один из ключевых факторов патогенеза большинства нарушений беременности, в том числе – преждевременных родов и преэклампсии [18]. В норме выраженность ОС увеличивается к концу первого триместра беременности. Это обусловлено тем, что в ранние сроки

беременности, в начале плацентации, развитие происходит в условиях пониженного парциального давления кислорода. По мере созревания плаценты и роста степени ее васкуляризации растет и потребление кислорода, а ее обильная митохондриальная масса способствует производству АФК [18, 19]. Эти изменения происходят по большей части в период органогенеза, когда эмбрион наиболее подвержен действию тератогенных факторов, в том числе – гипоксическому воздействию [20]. Плацентация у крыс заканчивается примерно на 13-е сут беременности [21], то есть гипоксическое воздействие на 10-е сут внутриутробного развития приходится на период интенсивной плацентации и возрастающего риска ОС, о чем может свидетельствовать наблюдаемое нами изменение уровня небелковых тиолов в крови и печени самок через сутки после моделирования гипоксии. Изменение показателей АОЗ в крови можно интерпретировать как изменения, возникающие не только в организме матери, но и в плаценте, а значит, потенциально влияющие на развивающийся плод [18]. Изменение показателей АОЗ в печени отражает изменения именно в организме матери в ответ на гипоксический стресс. В крови мы наблюдали увеличение уровня небелковых тиолов, в то время как в печени уровень небелковых тиолов, а также активность СОД снижались, что, вероятно, отражает развитие ОС.

Беременность у крыс длится в среднем 21–23 сут, то есть 21-е сут беременности можно считать предродовым периодом. По гистологическим данным, в этот период в плаценте активно развиваются деструктивные изменения, возрастает лизис

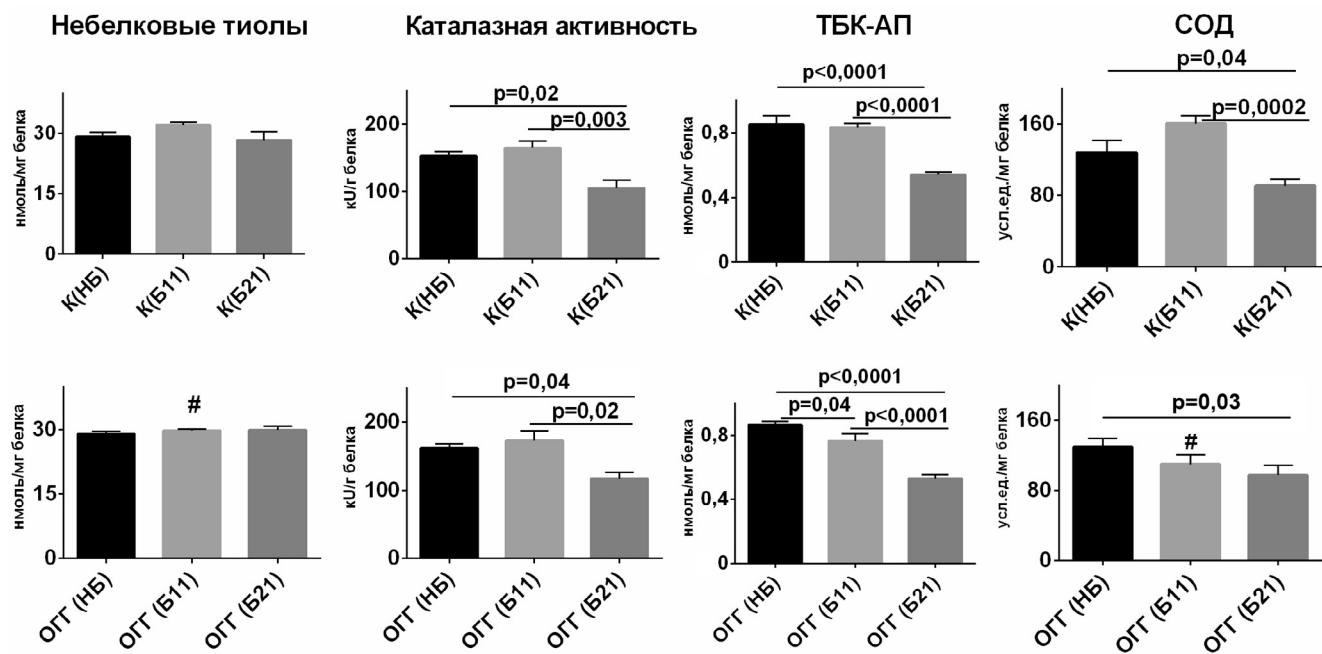


Рис. 2. Сравнение показателей ОС и АОЗ печени у небеременных и беременных самок в норме и при гипоксическом стрессе.

Условные обозначения: НБ – небеременные; Б – беременные; ОГГ – острая гипобарическая гипоксия.

– значимые отличия между соответствующими группами контрольных животных и животных, подвергавшихся воздействию ОГГ. Размеры выборок: К(НБ) = 8; ОГГ(НБ) = 14; К(Б11) = 8; ОГГ(Б11) = 10; К(Б21) = 8; ОГГ(Б21) = 8.

клеток вследствие подготовки к родам, в результате чего начинается каскадный синтез простагландинов плодового (ПГЕ2) и материнского (ПГФ2α) происхождения, что может сопровождаться развитием ОС [22]. Возможно, именно отражением возрастающего перед родами ОС в плаценте и обусловлено возрастание уровня ТБК-АП, поскольку их уровень определяется в том числе количеством включенного в метаболизм ПГЕ2, а также снижение ОАА и активности СОД3 в крови при физиологически развивающейся беременности. При этом в печени и уровень ТБК-АП, и ряд показателей АОЗ снижены, что также отражает развитие ОС перед родами. Снижение концентрации прооксидантов к концу беременности в периферических органах и тканях, особенно подверженных большому окислительному повреждению из-за слабой АОЗ и/или большого количества митохондрий, показано также в исследованиях Иконо и др. [23]. В то же время гипоксический стресс в нашем исследовании в предродовой период привел к значимому снижению как уровня церулоплазмина, так и ТБК-АП, что также можно трактовать как усиление развития ОС в плаценте, а значит возрастающую опасность для плода.

Беременность характеризуется динамическими изменениями во многих системах организма матери и развивающегося плода, что приводит к увеличению базального потребления кислорода. Многочисленные клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ОС может лежать в основе многих патологий, включая некоторые формы бесплодия, выкидыши, преэклампсию, задержку роста и развития плода, провоци-

руя преждевременные роды. Однако зачастую применение антиоксидантной терапии в клинике вместо ожидаемого улучшения в лучшем случае оказывается бесполезным, а порой еще больше отягощает течение беременности. Однозначных объяснений этому до сих пор нет. Наше исследование показывает, что одной из причин «неудачного опыта превентивного применения антиоксидантов» может быть то, что при этом не учитывается исходный баланс между маркерами ОС и показателями АОЗ. Увеличение продукции первых, как и снижение уровня вторых, – не всегда показатель развивающейся патологии, но может быть одним из вариантов нормы, подготавливающим организм матери и плода к приближающимся родам. Любые нарушения баланса уровня и активности про- и антиоксидантов могут приводить к серьезным последствиям, поэтому крайне важно понимать, как меняются эти показатели в разные периоды онтогенеза и принимать соответствующие меры коррекции строго при необходимости, что является основой для дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300071-8 и № 121032500076-1, а также при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Casanueva E., Viteri F.E. Iron and oxidative stress in pregnancy // J. Nutr. 2003. Vol. 133. N 5. P. 1700S–1708S.
2. Duhig K., Chappell L.C., Shennan A.H. Oxidative stress in pregnancy and reproduction // Obstet. Med. 2016. Vol. 9. N 3. P. 113–116.
3. Hubel C.A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1999. Vol. 222. N 3. P. 222–235.
4. Ademuyiwa O., Odusoga O.L., Adebawo O.O., Ugbaja R.N. Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy // Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2007. Vol. 86. N 10. P. 1175–1180.
5. Hung T.-H., Burton G.J. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia // Taiwan. J. Obstet. Gynecol. 2006. Vol. 45. N 3. P. 189–200.
6. Burton G.J., Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia // J. Soc. Gynecol. Investig. 2004. Vol. 11. N 6. P. 342–352.
7. Biondi C., Pavan B., Lunghi L., Fiorini S., Vesce F. The role and modulation of the oxidative balance in
- pregnancy // Curr. Pharm. Des. 2005. Vol. 11. N 16. P. 2075–2089.
8. Mamet J., Peyronnet J., Roux J.-C., Perrin D., Cottet-Emard J.-M., Pequignot J.-M., Lagercrantz H., Dalmaz Y. Long-term prenatal hypoxia alters maturation of adrenal medulla in rat // Pediatr. Res. 2002. Vol. 51. N 2. P. 207–214.
9. Chappell L.C., Seed P.T., Kelly F.J., Briley A., Hunt B.J., Charnock-Jones D.S., Mallet A., Poston L. Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function // Am. J. Obstet. Gynecol. 2002. Vol. 187. N 3. P. 777–784.
10. Poston L., Igosheva N., Mistry H.D., Seed P.T., Shennan A.H., Rana S., Karumanchi S.A., Chappell L.C. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders // Am. J. Clin. Nutr. 2011. Vol. 94. N 6. P. 1980S–1985S.
11. Zhao M., Liu T., Pang G. Intercellular wireless communication network between mother and fetus in rat pregnancy—a study on directed and weighted network // Reprod. Biol. Endocrinol. 2019. Vol. 17. N 1: 40.
12. Patten A.R., Fontaine C.J., Christie B.R. A comparison of the different animal models of fetal alcohol

- spectrum disorders and their use in studying complex behaviors // *Front. Pediatr.* 2014. Vol. 2: 93.
13. Clancy B., Finlay B.L., Darlington R.B., Anand K.J.S. Extrapolating brain development from experimental species to humans // *Neurotoxicology*. 2007. Vol. 28. N 5. P. 931–937.
14. Trofimova L., Lovat M., Groznaya E., Efimova E., Dunaeva T., Maslova M., Graf A., Bunik V. Behavioral impact of the regulation of the brain 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by synthetic phosphonate analog of 2-oxoglutarate: Implications into the role of the complex in neurodegenerative diseases // *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2010. Vol. 2010: 749061.
15. Zhidkova T.V., Proskurnina E.V., Parfenov E.A., Vladimirov Yu.A. Determination of superoxide dismutase and SOD-mimetic activities by a chemical system: $\text{Co}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{lucigenin}$ // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. Vol. 401. N 1. P. 381–386.
16. Pankratova M.S., Baizhumanov A.A., Yusipovich A.I., Faassen M., Shiryaeva T.Yu., Peterkova v.A., Kovalenko S.S., Kazakova T.A., Maksimov G.M. Imbalance in the blood antioxidant system in growth hormone-deficient children before and after 1 year of recombinant growth hormone therapy // *PeerJ*. 2015. Vol. 3: e1055.
17. Матюлько И.С., Байжуманов А.А., Хуразоева Е.Э., Маслова М.В. Влияние различных режимов питьевой депривации на систему антиоксидантной защиты крови и поведенческую активность крыс // Журн. мед.-биол. иссл. 2018. Т. 6. № 3. С. 254–261.
18. Jenkins C., Wilson R., Miller H., McKikkop J.H., Walker J.J. Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage // *Antioxid. Redox Signal.* 2000. Vol. 2. N 3. P. 623–628.
19. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta // *Histochem. Cell Biol.* 2004. Vol. 122. N 4. P. 369–382.
20. Джобава Э.М. Оксидативный стресс, дисфункция эндотелия, дисбаланс цитокинов, гонадотропный синергизм, или все о токофероле в практике врача акушера-гинеколога // *Акуш. гин. репрод.* 2018. Т. 12. № 3. С. 48–53.
21. Soares M.J., Chakraborty D., Karim Rumi M.A., Konno T., Renaud S.J. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface // *Placenta*. 2012. Vol. 33. N 4. P. 233–243.
22. Буркитова А.М., Полякова В.О., Болотских В.М., Кветной И.М. Особенности строения плаценты при переношенной беременности // Журн. акуш. жен. бол. 2019. Т. 68. № 6. С. 73–86.
23. Iacono A., Biano G., Raso G.M., Esposito E., di Villa Bianca R.d'E., Sorrentino R., Cuzzocrea S., Calignano A., Autore G., Meli R. Maternal adaptation in pregnant hypertensive rats: improvement of vascular and inflammatory variables and oxidative damage in the kidney // *Am. J. Hypertens.* 2009. Vol. 22. N 7. P. 777–783.

Поступила в редакцию 22.04.2021 г.

После доработки 06.07.2021 г.

Принята в печать 12.07.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

The antioxidant system activity during normal pregnancy and pregnancy following by hypoxic stress

A.V. Graf^{1,3} , A.A. Baizhumanov² , M.V. Maslova¹, Ya.V. Krushinskaya¹,
A.S. Maklakova¹, N.A. Sokolova¹, A.A. Kamensky^{1,*} 

¹Department of Human and Animal Physiology and ²Department of Biophysics, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, 119234, Moscow, Russia;

³Faculty of Nano-, Bio-, Informational, Cognitive and Socio-humanistic Sciences and Technologies
at Moscow Institute of Physics and Technology, Maximova st. 4, 123098, Moscow, Russia

*e-mail: kamensky_msu@mail.ru

Pregnancy in mammals is characterized by an increase in basal oxygen consumption, as it develops there is an increase in oxidative stress while in pregnancy complicated by hypoxic stress the oxidative damage enhances. The oxidative stress during prenatal development seems to be one of the key factors in the pathogenesis of most pregnancy disorders, including preterm birth and preeclampsia. The growing demand for oxygen increases either the production of reactive oxygen species or the synthesis of antioxidant defense components. To assess the antioxidant defense activity in rats, the content of non-protein thiols in the blood and liver homogenate, catalase activity in liver homogenate, superoxide dismutase activity in blood plasma and liver homogenate, total antioxidant activity in blood plasma, and the intensity of lipid peroxidation in blood plasma and liver homogenate were determined. According to data obtained a decrease in antioxidant defense activity in blood plasma and liver of females is shown in the prenatal period of normal pregnancy and, particularly, in the same period of pregnancy complicated by hypoxic stress. It can be assumed that changes in blood antioxidant defense parameters reflect changes not only in mother's body, but also in placenta, providing potential danger to the developing fetus.

Keywords: *prooxidant system, antioxidant system, oxidative stress, pregnancy, active products of thiobarbituric acid, superoxide dismutase*

Funding: This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number № 121032300071-8 и № 121032500076-1, by the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology”.

Сведения об авторах

Граф Анастасия Викторовна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: nastjushka@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3579-8089>

Байжуманов Адиль Ануарович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: baizhumanov@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9737-4516>

Маслова Мария Вадимовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: maslova_masha@mail.ru

Крушинская Янина Валерьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: yanyakr@mail.ru

Маклакова Анастасия Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: a_maklakova@mail.ru

Соколова Наталья Александровна — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: 1945@mail.ru

Каменский Андрей Александрович — док. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6496-0527>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.133

Роль активных форм кислорода в регуляции тонуса артерий дыхательной и локомоторной мышц крысы

А.А. Борзых^{1,*} , А.А. Швецова², И.В. Кузьмин³, С.В. Буравков⁴ ,
Д.К. Гайнуллина² , О.С. Тарасова^{1,2}

¹Лаборатория физиологии мышечной деятельности, Институт медико-биологических проблем,
Российская академия наук, Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76A;

²Кафедра физиологии человека и животных и ³кафедра генетики, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁴Кафедра экологической и экстремальной медицины, факультет фундаментальной медицины,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1

*e-mail: borzykh.anna@gmail.com

Продукция активных форм кислорода (АФК) в клетках скелетных мышц повышается при сокращении. Дыхательные и локомоторные мышцы отличаются режимами сокращения, поэтому продукция АФК и их влияние на сосуды в этих функционально разных типах мышц могут различаться. Целью работы было оценить роль АФК в регуляции тонуса артерии диафрагмы (*a. phrenica*) и глубокой артерии плеча (*a. profunda brachii*) крысы. Реакции кольцевых препаратов артерий исследовали в изометрическом режиме. Ингибитор NADPH-оксидазы (NOX) VAS2870 вызывал расслабление препаратов, величина реакции артерий диафрагмы была больше, чем артерий плеча: при концентрации VAS2870 1 мкМ сила сокращения снижалась до 33% и 91% от уровня предсокращения соответственно. Тирон («ловушка» O_2^-) обладал сходным профилем активности: в концентрации 10 мМ он вызывал снижение силы сокращения артерий диафрагмы до 38%, а артерий плеча — до 66% от исходной силы сокращения. Каталаза, разрушающая H_2O_2 , в концентрации 3000 Ед/мл не влияла на сокращение артерий диафрагмы, но увеличивала сокращение глубоких артерий плеча. Методом количественной полимеразной цепной реакции показано, что содержание мРНК изоформ NOX, *p22phox*, *p47phox*, *p67phox*, *Poldip2*, *Gpx-1*, *SOD-1* и каталазы в ткани двух артерий не различается, тогда как содержание мРНК *SOD-3* в артериях диафрагмы ниже, чем в артериях плеча. Таким образом, продуцируемый NOX O_2^- сильнее увеличивает тоническое сокращение артерий диафрагмы, чем артерий локомоторной мышцы. H_2O_2 , напротив, вызывает расслабление артерий локомоторной мышцы, но не артерий диафрагмы. Одной из причин выраженного влияния O_2^- в артериях диафрагмы может быть сравнительно низкий уровень экспрессии *SOD-3*.

Ключевые слова: резистивные артерии, диафрагма, сокращение, активные формы кислорода, NADPH-оксидаза, супероксиддисмутазы

Повышение продукции активных форм кислорода (АФК) служит одним из механизмов патогенеза заболеваний респираторной и сердечно-сосудистой систем [1]. Вместе с тем при умеренной продукции АФК могут принимать участие в регуляции тонуса сосудов путем влияния на активность многих сигнальных путей в клетках сосудистой стенки [2]. Известно, что супероксидный анион-радикал (O_2^-) и пероксид водорода (H_2O_2) могут вызывать как сужение, так и расширение резистивных артерий [3].

Основным источником АФК в клетках артерий является NADPH-оксидазный ферментативный комплекс (NOX), расположенный в наруж-

ной мемbrane клеток [2]. Из семи изоформ NOX, описанных в клетках млекопитающих, в артериях встречаются NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 (только у человека) и DUOX1/2. Активность NOX регулируется большим количеством сигнальных путей и белок-белковыми взаимодействиями. NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 образуют комплексы с мембранным белком p22phox. Кроме того, NOX1, NOX2 и NOX3 ассоциированы с цитозольными регуляторными субъединицами: NOX1 и NOX3 — с NOXA1, NOXA1 и Rac1, NOX2 — с p47phox, p67phox и Rac1, а NOX4 — с poldip2. NOX4 и Duox1/2 могут быть конститутивно активными без ассоциации с регуляторными

субъединицами. Основным продуктом NOX4 и DUOX1/2 является H_2O_2 , остальные изоформы продуцируют O_2^- [2, 4]. O_2^- имеет короткое время жизни и быстро превращается в более стабильную молекулу H_2O_2 , эта реакция ускоряется супероксиддисмутазами (SOD) [5]. Важно отметить, что содержание различных изоформ и регуляторных субъединиц NADPH-оксидазы может существенно различаться в артериях разных органов [4].

Известно, что сократительная активность скелетных мышц связана с повышением продукции АФК в мышечных волокнах [6]. Продукция АФК также может увеличиваться в артериях, снабжающих работающие мышцы кровью, например, при повышении создаваемого током крови напряжения сдвига на эндотелии [7]. Дыхательные и локомоторные мышцы различаются режимами сократительной активности: дыхательные мышцы постоянно ритмически активны [8] и отличаются от локомоторных мышц по кровоснабжению и метаболическим характеристикам мышечной ткани [9–11]. Это может быть причиной разной продукции АФК и их участия в регуляции тонуса артерий дыхательных и локомоторных мышц.

Целью данной работы было проверить гипотезу о различной роли АФК в регуляции тонуса артерий дыхательных и локомоторных мышц. Для этого мы исследовали изменения сократительных ответов артерий диафрагмы (основной инспираторной мышцы млекопитающих) и трехглавой мышцы плеча (локомоторная мышца) при фармакологической модуляции продукции или деградации АФК, а также оценивали уровни экспрессии мРНК структурных и регуляторных субъединиц NADPH-оксидазного комплекса и ферментов, разрушающих АФК: каталазы, супероксиддисмутазы (*SOD-1*, *SOD-2*, *SOD-3*) и глутатионпероксидазы-1 (*Gpx-1*).

Материалы и методы

Животные и объекты исследования. Исследование проводили на половозрелых самцах крыс Вистар с массой тела 350–400 г. Животных содержали в виварии с контролируемой температурой и световым циклом 12/12 ч. Воду и корм для грызунов (ООО «Лабораторкорм», Москва) крысы получали *ad libitum*. Крыс наркотизировали CO_2 и декапитировали гильотиной, далее выделяли артерию диафрагмы (*a. phrenica*) и глубокую артерию плеча (*a. profunda brachii*).

Исследование реакций изолированных артерий. Из артерий вырезали кольцевые препараты длиной 2 мм и помещали их в камеры многоканального изометрического миографа (410A или 620M, DMT, Дания). Показания тензометрических датчиков оцифровывали с частотой 10 Гц (использовали аналого-цифровой преобразователь E14-140M, L-CARD, Россия) и записывали на жесткий диск компьютера с помощью программы PowerGraph

3.3 (ДИСофт, Россия). Каждая камера миографа содержала 5 мл раствора следующего состава (мМ): $NaCl$ – 120; $NaHCO_3$ – 26; KCl – 4,5; $CaCl_2$ – 1,6; $MgSO_4$ – 1,0; NaH_2PO_4 – 1,2; D-глюкоза – 5,5; EDTA – 0,025; HEPES – 5,0. В течение эксперимента раствор непрерывно аэрировали карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2) для поддержания pH 7,4. После нагрева раствора до 37°C (в течение 30 мин) определяли растяжение препарата, оптимальное для проявления его сократительной активности, в ходе этой процедуры также вычисляли внутренний диаметр артерий [12]. Затем препараты активировали последовательным добавлением KCl (60 мМ), норадреналина (10 мкМ) и метоксамина (10 мкМ); длительность каждого воздействия составляла 5 мин, отмывку препарата от вещества проводили путем трехкратной замены раствора с интервалами 5 мин. Для оценки состояния эндотелия на препараты артерий, предварительно сокращенные метоксамином (2–4 мкМ), действовали ацетилхолином (10 мкМ).

Далее проводили оценку влияния АФК, продукции которых NOX, на тонус артерий с помощью ингибитора всех изоформ NADPH-оксидаз VAS2870 [13]. Изучение селективного вклада O_2^- или H_2O_2 проводили с помощью тирона (двунатриевая соль 4,5-дигидрокси-1,3-бензодисульфоновой кислоты – «ловушка» O_2^-) [14] или каталазы.

В первой и второй сериях экспериментов исследовали влияние VAS2870 (диапазон концентраций – от 0,1 до 30 мкМ) и тирона (от 0,1 до 10 мМ) на фоне предварительного сокращения препаратов метоксамином (агонист α_1 -адренорецепторов) в концентрации, вызывающей 60–70% максимального ответа (2–4 мкМ). Исследуемые вещества добавляли в камеру миографа кумулятивно, действие каждой концентрации длилось 5 мин (рис. 1А). Параллельно проводили контрольные эксперименты, в которых вместо исследуемых веществ в камеру миографа добавляли эквивалентный объем растворителя: DMFA (диметилформамид) для VAS2870 или раствор для миографа для тирона. Препараты предварительно инкубировали в течение 20 мин с ингибитором NO-синтазы L-NNA (N^{ω} -нитро-L-аргинин, 100 мкМ) для исключения дилататорного влияния эндогенного NO. Это обеспечивало достаточно стабильный уровень тонического сокращения препаратов, что важно для оценки сравнительно медленных эффектов антиоксидантов. В итоге за время, необходимое для исследования влияния VAS2870 или тирона, уменьшение уровня предсокращения артерий в контрольных экспериментах составляло всего 10–20% (рис. 1Б, 1В).

В третьей серии экспериментов исследовали влияние каталазы на величину сократительного ответа препаратов при однократном добавлении метоксамина в концентрации 1 мкМ (обеспечивает умеренное повышение силы до 30–40% от

максимального уровня [15]). До добавления метоксамина препараты в течение 20 мин инкубировали с каталазой (3000 Ед/мл, активность – не менее 10000 Ед/мг белка), а в контрольных экспериментах – в растворе без каталазы.

Все использованные фармакологические препараты были получены из Sigma (США), кроме L-NNA (ALEXIS Biochemicals, США) и DMFA (диметилформамид, PanReac, США). Конечная концентрация DMFA в камере миографа составляла 0,3% (% об.).

Обработку результатов проводили с использованием программ PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия) и GraphPad Prism 7.0 (США). Реакции препаратов на VAS2870 и тирон оценивали по уровню силы сокращения, до которого она снижалась при фармакологических воздействиях (за 100% принимали уровень предсокращения). Влияние каталазы оценивали путем сопоставления сократительных ответов препаратов, инкубированных в присутствии и в отсутствие фермента (сократительные ответы выражали в % от максимальной силы сокращения). Чувствительность артерий к VAS2870 оценивали по величине pD₂ (отрицательный логарифм EC₅₀ – концентрации агониста, вызывающей 50% расслабления от исходного уровня сокращения).

Исследование экспрессии генов (количественная полимеразная цепная реакция – ПЦР). Для приготовления одного образца ткани использовали артерии трех крыс. Артерии быстро очищали от окружающих тканей и помещали в буфер RNA-later (Qiagen, Германия), в котором их хранили при –20°C до выделения мРНК. Экстракцию тотальной РНК из образцов проводили с помощью набора «Clean RNA Standard» (Евроген, Россия) по протоколу производителя с некоторыми моди-

фикациями. Концентрацию нуклеотидов в полученных образцах определяли с помощью спектрофотометра (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США). Полученные образцы РНК были обработаны ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для синтеза комплементарной ДНК на матрице тотальной РНК (150 нг) проводили обратную транскрипцию с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) и праймеров со случайными последовательностями нуклеотидов длиной 6 п.н., согласно прилагаемой инструкции. Синтезированную кДНК хранили при –20°C до проведения количественной полимеразной цепной реакции. Праймеры для проведения ПЦР были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия).

Последовательности прямых и обратных праймеров для референсного гена (β -актина) и ряда исследуемых генов (*NOX2*, *NOX3*, *NOX4*, *p22phox*, *p47phox*, *p67phox*, *poldip2*, каталаза, *SOD-1*, *SOD-2*, *SOD-3*, *Gpx-1*) были взяты из опубликованных статей [16–20]. Праймеры для гена *NOX1* были подобраны с помощью программы UGENE (<http://ugene.unipro.ru>, Россия). ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Программа амплификации включала начальную денатурацию при 95°C (10 мин), 40 циклов ПЦР (30 с при 95°C, 30 с при 60°C и 60 с при 72°C) и заключительную инкубацию при 72°C (10 мин).

Содержание мРНК каждого из исследуемых генов нормировали на содержание мРНК β -актина (референсный ген) в том же образце. Далее данные по экспрессии генов в артериях диафрагмы выражали в процентах от среднего значения в артерии плеча.

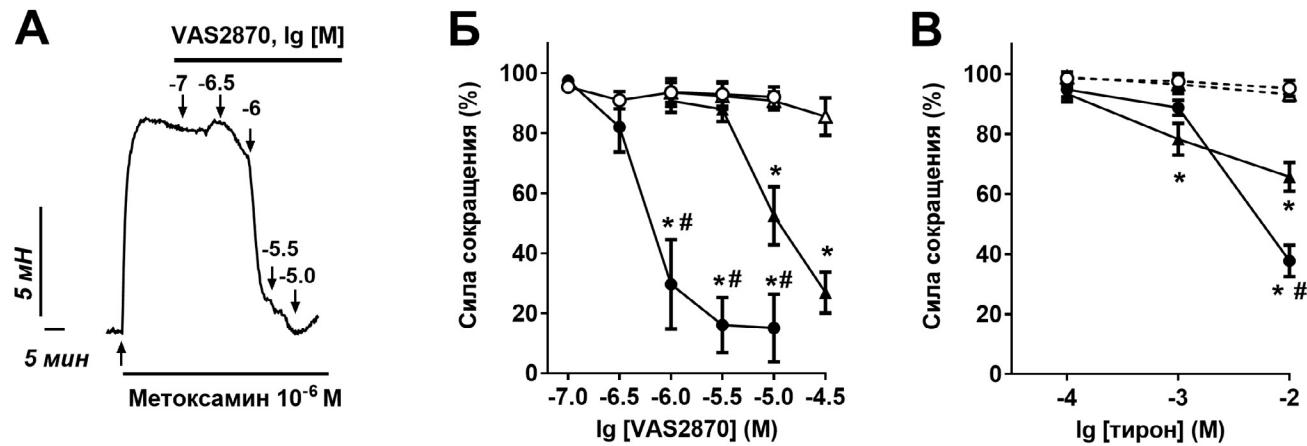


Рис. 1. Исследование влияния АФК на вазомоторные ответы артерий диафрагмы и глубокой артерии плеча. А. Ингибитор NADPH-оксидазы (VAS2870) при аппликации на предварительно сокращенный препарат артерии диафрагмы вызывает расслабление (фрагмент оригинальной записи эксперимента). Б–В. Реакции расслабления артерий диафрагмы (кружки) и глубокой артерии плеча (треугольники) на VAS2870 (Б, n=6) и тирон (В, n=7) (закрашенные символы) или эквивалентного объема растворителя (DMFA для VAS2870 или раствора для миографа для тирона) (пустые символы). Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего. * – p<0,05 по сравнению с растворителем, # – p<0,05 по сравнению с глубокой артерией плеча (дисперсионный анализ для повторных измерений с поправкой Сидака на множественные сравнения).

Статистический анализ данных. Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7.0. Нормальность распределения значений оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения данные представляли в виде среднего и ошибки среднего, различия между группами оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Сидака на множественные сравнения или t -критерия Стьюдента. Если распределение данных отличалось от нормального, их представляли в виде медианы и межквартильного размаха и проводили анализ с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни или Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$; n – объем выборки (количество животных или образцов ткани).

Результаты и обсуждение

Внутренний диаметр артерии диафрагмы составил $249,0 \pm 4,8$ мкм и был несколько меньше, чем диаметр глубокой артерии плеча – $268,8 \pm 7,5$ мкм ($p < 0,05$).

Ингибирование всех изоформ NADPH-оксидазы вызывало расслабление артерий, выраженность которого существенно различалась в артериях диафрагмы и артериях плеча. Артерии диафрагмы демонстрировали более выраженные реакции расслабления на VAS2870 (рис. 1Б). При действии ингибитора в концентрации 1 мкМ уровень силы сокращения артерий диафрагмы составил $33 \pm 18\%$, а силы сокращения артерий плеча – $-91 \pm 5\%$ ($p < 0,05$). Чувствительность артерий диафрагмы к VAS2870 также была значительно выше по сравнению с чувствительностью глубоких артерий плеча: значения pD_2 составили $6,0 \pm 0,2$ и $4,9 \pm 0,1$ соответственно ($p < 0,05$).

Итак, блокада NADPH-оксидаз приводила к расслаблению артерий, т.е. АФК, продуцируемые NOX, вызывают сокращение препаратов артерий диафрагмы и артерий плеча. Известно, что супероксидный анион-радикал как сам по себе, так и после превращения в пероксид водорода может приводить к сокращению гладкомышечных клеток [3, 21]. Чтобы определить, какой тип АФК принимает участие в регуляции тонуса артерий диафрагмы и глубокой артерии плеча, далее мы исследовали влияние тирона («ловушка» O_2^-) и каталазы, разрушающей H_2O_2 , на сократительные ответы.

Как и VAS2870, тирон вызывал расслабление препаратов (рис. 1В), причем влияние тирона на тонус артерий диафрагмы также было выражено значительно сильнее, чем на тонус артерий плеча. При действии тирона в концентрации 10 мМ артерии диафрагмы расслаблялись до $38 \pm 5\%$, а артерии плеча – до $66 \pm 5\%$ от исходного уровня сокращения ($p < 0,05$). Таким образом, O_2^- потенцирует сократительные реакции артерий диа-

фрагмы значительно сильнее, чем реакции артерий плеча.

Каталаза увеличивала сократительные ответы артерий плеча на метоксамин (1 мкМ), но не оказывала такого влияния на артерии диафрагмы. Величина сократительного ответа препаратов артерий плеча в контрольных экспериментах составила $46 \pm 3\%$ от максимального уровня сокращения, а после инкубации с каталазой – $63 \pm 3\%$ ($p < 0,05$). Вместе с тем инкубация с каталазой не оказала значимого влияния на сократительный ответ артерий диафрагмы в контрольных экспериментах – $39 \pm 8\%$, в присутствии каталазы – $47 \pm 6\%$ ($p > 0,05$). Таким образом, снижение содержания H_2O_2 в сосудистой стенке под действием каталазы потенцирует сокращение артерий плеча, но не влияет на сокращение артерий диафрагмы. Это говорит о том, что H_2O_2 уменьшает сократительные ответы артерий плеча, но не артерий диафрагмы. Сопоставляя результаты экспериментов с использованием тирона и каталазы, можно заключить, что выраженное уменьшение сократительных ответов артерий диафрагмы при ингибировании NADPH-оксидазы было обусловлено подавлением сократительного влияния O_2^- , а не H_2O_2 . В условиях наших экспериментов продукция O_2^- в клетках сосуда могла либо происходить постоянно, под действием растяжения сосудистой стенки в миографе [22], либо усиливаться при активации α_1 -адренорецепторов метоксамином, как было показано ранее при использовании другого агониста этих рецепторов – фенилэфрина [23, 24]. Сравнение эффектов этих воздействий на продукцию O_2^- в двух исследованных нами артериях – одно из возможных направлений развития данной работы.

Следует отметить, что АФК, продуцируемые эндотелиальными клетками, также обладают вазомоторным действием. С одной стороны, продукция O_2^- может потенцировать сократительные ответы путем снижения биодоступности NO – ключевого эндотелиального фактора в мелких артериях крысы [25–27]. С другой стороны, H_2O_2 является одним из факторов эндотелий-зависимой вазорелаксации, при этом субстратом для его синтеза служит O_2^- , поставляемый эндотелиальной NO-синтазой [28, 29]. В наших экспериментах активность NO-синтазы была подавлена с использованием L-NNA, что ограничивало влияние АФК, продуцируемых сосудистым эндотелием.

Далее представлялось важным исследовать, связаны ли выявленные нами особенности регуляторной роли NADPH-оксидазы в двух исследованных артериях с различиями в экспрессии генов, кодирующих субъединицы этого ферментного комплекса. Прежде всего следует отметить, что в ткани обеих артерий уровни экспрессии изоформ NOX2 и NOX4 были на два порядка выше, чем изоформ NOX1 и NOX3 ($p < 0,05$, данные не

представлены). На основании значительного вклада АФК, продуцируемых NADPH-оксидазой, в регуляцию сократимости артерий диафрагмы мы предположили, что уровни экспрессии субъединиц NADPH-оксидазы в этих артериях выше, чем в глубоких артериях плеча. Однако содержание мРНК изоформ NOX (*NOX2*, *NOX4*), а также структурной (*p22phox*) и регуляторных субъединиц (*p47phox*, *p67phox*, *Poldip2*) в артериях диафрагмы и артериях плеча не различалось (рис. 2).

Поскольку общий уровень АФК в клетке зависит от соотношения активностей прооксидантной и антиоксидантной систем [30], на следующем этапе работы исследовали уровни экспрессии

генов антиоксидантной системы (рис. 2). Содержание мРНК цитоплазматической *SOD-1*, *Gpx-1* и каталазы не различалось в артериях диафрагмы и артериях плеча. Уровень экспрессии митохондриальной *SOD-2* был выше на 20%, тогда как экспрессия внеклеточной изоформы *SOD-3* меньше в артериях диафрагмы по сравнению с артериями плеча на 28% ($p<0,05$) (рис. 2).

Возможно, больший вклад АФК, продуцируемых NADPH-оксидазой, в реакции сокращения артерий дыхательных мышц связан с низким уровнем экспрессии *SOD-3* (рис. 3). Снижение экспрессии *SOD-3* может приводить к повышению концентрации супероксидного анион-ради-

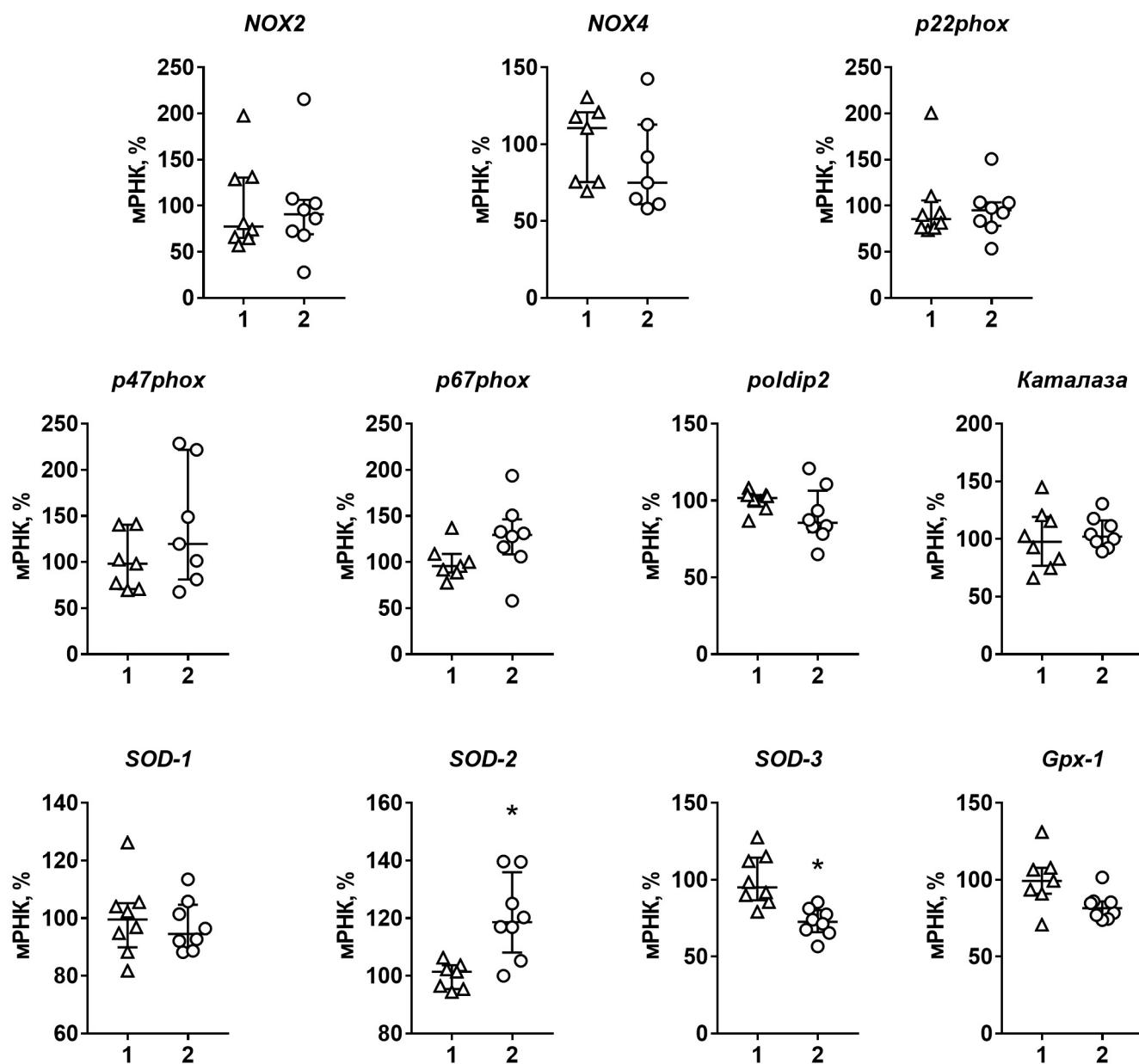


Рис. 2. Содержание мРНК изоформ NADPH-оксидазы (*NOX*), ее структурной (*p22phox*, *p67phox*, *poldip2*) и регуляторных (*p47phox*, *p67phox*, *Gpx-1*) субъединиц, а также ферментов, разрушающих АФК (каталазы, трех изоформ супероксиддисмутазы (*SOD*) и глутатион-пероксидазы-1 (*Gpx-1*)) в глубоких артериях плеча (1, треугольники) и артериях диафрагмы (2, кружки). Содержание мРНК цеплевых генов нормировано на содержание мРНК β-актина в том же образце ткани и затем выражено в процентах от среднего значения в глубокой артерии плеча. Данные приведены в виде медианы и межквартильного размаха, $n=7-8$, * – $p<0,05$ по сравнению с глубокой артерией плеча (критерий Манна-Уитни).

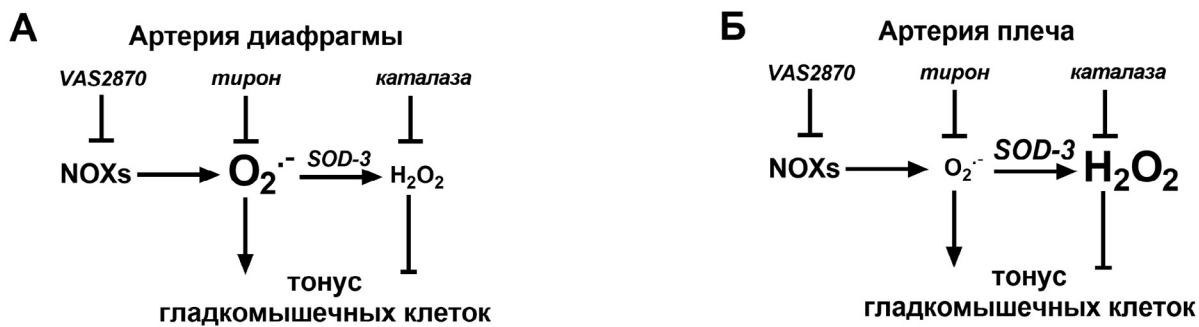


Рис. 3. Предполагаемая схема участия АФК в регуляции тонуса артерии диафрагмы (A) и глубокой артерии плеча (Б). А. В артерии диафрагмы преобладает сократительное влияние O_2^- : VAS2870 (ингибитор NOX) и тирон («ловушка» O_2^-) вызывают выраженное расслабление, а каталаза (фермент, разрушающий H_2O_2) не влияет на сокращение. Б. В артерии плеча преобладает релаксирующее влияние H_2O_2 : VAS2870 и тирон не оказывают выраженного влияния на сократительные ответы, а каталаза приводит к увеличению сокращения. Тип доминирующей вазоактивной формы АФК зависит от уровня экспрессии SOD-3, который значительно ниже в артерии диафрагмы, чем в артерии плеча.

кала, что, вероятно, объясняет высокую чувствительность артерий диафрагмы к VAS2870 и тирону, которые блокируют продукцию супeroxидного анион-радикала или снижают его содержание в сосудистой стенке. Кроме повышения содержания O_2^- , снижение экспрессии SOD-3 может уменьшать продукцию H_2O_2 и тем самым ослаблять действие каталазы на артерии диафрагмы. Следует отметить, что SOD-3 катализирует превращение O_2^- в H_2O_2 и O_2 на поверхности клеточной мембраны, где располагаются белки-мишени, на активность которых может влиять O_2^- . Известно, что супeroxидный анион-радикал может вызывать сокращение гладкомышечных клеток артерий, увеличивая вход кальция в клетку через потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа [31]. Кроме того, O_2^- может активировать RhoA/Rho-киназный путь [21, 32], для активации которого в гладкомышечных клетках необходимо перемещение Rho-киназы из цитозоля к наружной мемbrane клетки [33]. Поскольку SOD-2 катализирует превращение O_2^- в H_2O_2 и O_2 в другом компартменте клетки (матриксе митохондрий), ее ферментативная активность должна в меньшей степени влиять на актив-

ность мембранных ферментов и ионных каналов, чем изменение активности SOD-3.

Таким образом, мы впервые показали, что вклад супeroxидного анион-радикала в регуляцию тонуса артерий дыхательной мускулатуры намного больше, чем артерий локомоторной мускулатуры. Артерии дыхательной мускулатуры отличаются высокой чувствительностью к ингибированию NADPH-оксидазы, что может быть обусловлено различиями в скорости деградации O_2^- в клетках сосудистой стенки или же в уровне активности сигнальных путей, находящихся под влиянием O_2^- . Механизмы влияния АФК на тонус артерий диафрагмы являются предметом для дальнейших исследований.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-00060). Проведение экспериментов осуществлялось с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике Института медико-биологических проблем РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aldosari S., Awad M., Harrington E.O., Sellke F.W., Abid M.R. Subcellular reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular pathophysiology // Antioxidants (Basel). 2018. Vol. 7. N 1: 14.
2. Tejero J., Shiva S., Gladwin M.T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation // Physiol. Rev. 2019. Vol. 99. N 1. P. 311–379.
3. Knock G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension // Free Radic. Biol. Med. 2019. Vol. 145. P. 385–427.
4. Lassègue B., Martín A., Griendling K.K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH
- oxidases in the cardiovascular system // Circ. Res. 2012. Vol. 110. N 10. P. 1364–1390.
5. Wang Y., Branicky R., Noë A., Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling // J. Cell Biol. 2018. Vol. 217. N 6. P. 1915–1928.
6. Powers S.K., Radak Z., Ji L.L. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future // J. Physiol. 2016. Vol. 594. N 18. P. 5081–5092.
7. Chatterjee S., Fisher A.B. Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow // Antioxid. Redox Signal. 2014. Vol. 20. N 6. P. 899–913.

8. Hussain S.N. Regulation of ventilatory muscle blood flow // *J. Appl. Physiol.* 1996. Vol. 81. N 4. P. 1455–1468.
9. Polla B., D'Antona G., Bottinelli R., Reggiani C. Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity // *Thorax*. 2004. Vol. 59. N 9. P. 808–817.
10. Borzykh A.A., Vinogradova O.L., Tarasova O.S. Diaphragm: The relationship between blood supply regulation and characteristics of the contractile function // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 2. P. 41–49.
11. Tarasova O.S., Kalenchuk V.U., Borzykh A.A., Andreev-Andrievsky A.A., Burakov S.V., Sharova A.P., Vinogradova O.L. A comparative analysis of the vasomotor responses and innervation of small arteries in rat locomotor and respiratory muscles // *Biophysics*. 2008. Vol. 53. N 6. P. 621–625.
12. Mulvany M.J., Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats // *Circ. Res.* 1977. Vol. 41. N 1. P. 19–26.
13. Altenhöfer S., Kleikers P.W.M., Radermacher K.A., Scheurer P., Hermans J.J.R., Schijf P., Ho H., Wingler K., Schmidt H.H.H.W. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease // *Cell Mol. Life Sci.* 2012. Vol. 69. N 14. P. 2327–2343.
14. Taiwo F.A. Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons // *Spectroscopy*. 2008. Vol. 22. N 6. P. 491–498.
15. Borzykh A.A., Andreev-Andrievskiy A.A., Kalenchuk V.U., Mochalov S.V., Burakov S.V., Kuzmin I.V., Borovik A.S., Vinogradova O.L., Tarasova O.S. Strategies of adaptation of small arteries in diaphragm and gastrocnemius muscle to aerobic exercise training // *Hum. Physiol.* 2017. Vol. 43. N 4. P. 437–445.
16. Braun D., Zollbrecht C., Dietze S., Schubert R., Golz S., Summer H., Persson P.B., Carlström M., Ludwig M., Patzak A. Hypoxia/reoxygenation of rat renal arteries impairs vasorelaxation via modulation of endothelium-independent sGC/cGMP/PKG signaling // *Front. Physiol.* 2018. Vol. 9: 480.
17. Li H., Wang Y., Feng D., Liu Y., Xu M., Gao A., Tian F., Zhang L., Cui Y., Wang Z., Chen G. Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin // *J. Pineal. Res.* 2014. Vol. 57. N 1. P. 110–119.
18. Chen X., Qi L., Fan X., Tao H., Zhang M., Gao Q., Liu Y., Xu T., Zhang P., Su H., Tang J., Xu Z. Prenatal hypoxia affected endothelium-dependent vasodilation in mesenteric arteries of aged offspring via increased oxidative stress // *Hypertens. Res.* 2019. Vol. 42. N 6. P. 863–875.
19. Lima T.I., Monteiro I.C., Valença S., Leal-Cardoso J.H., Fortunato R.S., Carvalho D.P., Teodoro B.G., Ceccatto V.M. Effect of exercise training on liver antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats // *Life Sci.* 2015. Vol. 128. P. 64–71.
20. Lyle A.N., Deshpande N.N., Taniyama Y., Seidel-Rogol B., Poukova L., Du P., Papaharalambus C., Lassègue B., Griendling K.K. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells // *Circ. Res.* 2009. Vol. 105. N 3. P. 249–259.
21. Knock G.A., Snetkov V.A., Shaifta Y., Connolly M., Drndarski S., Noah A., Pourmahram G.E., Becker S., Aaronson P.I., Ward J.P.T. Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. Vol. 46. N 5. P. 633–642.
22. Lai E.Y., Wellstein A., Welch W.J., Wilcox C.S. Superoxide modulates myogenic contractions of mouse afferent arterioles // *Hypertension*. 2011. Vol. 58. N. 4. P. 650–656.
23. Tsai M-H., Jiang M.J. Reactive oxygen species are involved in regulating alpha1-adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction // *J. Biomed. Sci.* 2010. Vol. 17. N 1: 67.
24. Bleeke T., Zhang H., Madamanchi N., Patterson C., Faber J.E. Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species // *Circ. Res.* 2004. Vol. 94. N 1. P. 37–45.
25. Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K., Owada M.K., Nakaike R., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nagao T., Egashira K., Fujishima M., Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1996. Vol. 28. N 5. P. 703–711.
26. Garland C.J., Plane F., Kemp B.K., Cocks T.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone // *Trends Pharmacol. Sci.* 1995. Vol. 16. N 1. P. 23–30.
27. Kuzkaya N., Weissmann N., Harrison D.G., Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 25. P. 22546–22554.
28. Shimokawa H. Reactive oxygen species in cardiovascular health and disease: special references to nitric oxide, hydrogen peroxide, and Rho-kinase // *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020. Vol. 66. N 2. P. 83–91.
29. Knock G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. Vol. 145. P. 385–427.
30. Montezano A.C., Touyz R.M. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. Series: Integrated systems physiology. Glasgow: Morgan & Claypool, 2012. 102 pp.
31. Vogel P.A., Yang X., Moss N.G., Arendshorst W.J. Superoxide enhances Ca^{2+} entry through L-type channels in the renal afferent arteriole // *Hypertension*. 2015. Vol. 66. N 2. P. 374–381.
32. Jin L., Ying Z., Webb R.C. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004. Vol. 287. N 4. P. H1495–H1500.
33. Somlyo A.P., Somlyo A.V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. N 4. P. 1325–1358.

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята в печать 09.07.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Role of reactive oxygen species in tone regulation of respiratory and locomotor muscle feed arteries in the rat

A.A. Borzykh^{1,*} , A.A. Shvetsova², I.V. Kuzmin³, S.V. Buravkov⁴ , D.K. Gaynullina² , O.S. Tarasova^{1,2} 

¹Laboratory of Exercise Physiology, Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76A, Moscow, 123007 Russia;

²Department of Human and Animal Physiology and ³Department of Genetics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁴Department of Ecological and Extreme Medicine, Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy prospect 27–1, Moscow, 119192, Russia

*e-mail: borzykh.anna@gmail.com

The skeletal muscles contractile activity is associated with increased reactive oxygen species (ROS) production. Respiratory and locomotor muscles differ in the patterns of contractile activity, which can create different conditions for ROS production and their effect on feed arteries. The aim of this work was to study the role of ROS, including produced by NADPH oxidases (NOX), in diaphragm artery (*a. phrenica*) and deep shoulder artery (*a. profunda brachii*) tone regulation of the rat. Vasomotor responses of arterial preparations were studied in isometric regimen. The NOX inhibitor, VAS2870, caused relaxation, which was more pronounced in the diaphragm arteries compared to the shoulder arteries: at the concentration of 1 μ M, the diaphragm arteries relaxed to 33%, and the shoulder arteries – to 91% of the precontraction level. Tiron (O_2^- scavenger) showed similar results: at the 10 mM concentration, it caused relaxation of the diaphragm arteries to 38%, and the shoulder arteries – to 66%. At the same time, catalase (3000 U/ml) increased the deep shoulder arteries contraction but did not affect it in the diaphragm arteries. Using quantitative PCR, it was shown that the contents of mRNA isoforms *NOX*, *p22phox*, *p47phox*, *p67phox*, *Poldip2*, *Gpx-1*, *SOD-1* and catalase do not differ between arteries, while the content of *SOD-3* mRNA in the diaphragm arteries is less than in the shoulder arteries. Thus, the contribution of ROS, produced by NOX, to the feed arteries tone regulation of the respiratory muscles is higher than in the locomotor muscles. Experiments using tiron and catalase have shown that O_2^- increases the arteries contractile responses, while H_2O_2 , on the contrary, causes the shoulder arteries relaxation. One of the reasons for the more pronounced effect of O_2^- in the diaphragm arteries may be the relatively low *SOD-3* expression.

Keywords: resistance arteries, diaphragm, contraction, reactive oxygen species, NADPH-oxidase, superoxide dismutase

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-75-00060.

Сведения об авторах

Борзых Анна Анатольевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-67-15; e-mail: borzykh.anna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3763-5953>

Швецова Анастасия Алексеевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

Кузмин Илья Владимирович – канд. биол. наук, доц. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: kuzmin.ilya@gmail.com

Бураков Сергей Валентинович – докт. мед. наук, вед. науч. сотр. кафедры экстремальной и экологической медицины факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-495-932-99-04; e-mail: burakov@fbm.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>

Гайнуллина Дина Камилевна – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: dina.gaynullina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5104-2399>

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.21

Влияние линкерной ДНК на структуру нуклеосом по данным флуоресцентной микроскопии одиночных частиц

**Т.В. Андреева¹, А.В. Любителев¹, Н.В. Малюченко¹, В.М. Студитский^{1,2},
М.П. Кирпичников^{1,3} , А.В. Феофанов^{1,3,*}**

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

² Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA;

³ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российской академия наук, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

**e-mail: ayfeofanov@yandex.ru*

Мононуклеосомы, собранные на ДНК-матрицах различной длины, содержащих нуклеосом-позиционирующую последовательность, широко применяются в молекулярно-биологических исследованиях, но их структурные особенности требуют детального изучения. Методом флуоресцентной микроскопии одиночных частиц на основе Ферстетровского резонансного переноса энергии проведено сравнительное исследование структуры нуклеосом с двумя линкерными участками ДНК длиной по 20 п.н. (2LN) и коронуклеосом без линкеров (CN) в растворах, содержащих 150 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ (или без MgCl₂), а также в растворах с повышенной ионной силой (0,5 и 0,7 М KCl). Обнаружено, что эти нуклеосомы присутствуют в виде двух доминирующих субпопуляций, отличающихся по укладке ДНК на октамере гистонов. Установлено, что CN и 2LN различаются по соотношению этих субпопуляций и отличия возрастают в присутствии ионов Mg²⁺. При повышении ионной силы происходят конформационные перестройки в коровой области нуклеосом, характер которых отличается у 2LN и CN при 0,5 М KCl, но становится сходным при 0,7 М KCl. Полученные данные указывают на то, что, несмотря на похожие конформации, характерные для 2LN и CN, одни и те же факторы могут оказывать различное влияние на структуру этих нуклеосом. Это необходимо учитывать в том числе и при изучении взаимодействия мононуклеосом с различными ядерными белками *in vitro*.

Ключевые слова: структура нуклеосом, влияние ионов, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула, конформационные перестройки

Мононуклеосомы, которые могут быть собраны на основе октамиера гистонов и ДНК-матриц различной длины, содержащих нуклеосом-позиционирующую последовательность, широко используются в молекулярно-биологических исследованиях [1–7]. В настоящее время значительная часть таких исследований выполняется на коронуклеосомах, не имеющих линкерных участков ДНК (линкеров) [1, 6, 7]. В других случаях изучаемые нуклеосомы имеют линкеры (один или два), а их длина изменяется в широких пределах [1, 2, 4, 5, 8]. При столь широкой вариабельности используемых мононуклеосом возникают вопросы о возможной зависимости результатов изучения молекулярных взаимодействий от наличия, числа и длины линкеров, а также о правомерности прямого сравнения данных, полученных в различных исследованиях.

Опубликованные данные свидетельствуют о том, что длина линкеров может влиять на струк-

туру коровой области и взаимодействия нуклеосом. Например, показано, что при наличии линкерной ДНК длиной 30 п.н. или меньше происходит спонтанное частичное отворачивание нуклеосомной ДНК от октамиера гистонов [8]. Установлено, что укладка ДНК на октамиере гистонов в нуклеосомах с одним линкером изменяется при увеличении длины линкера от 20 до 135 п.н. [9]. Продемонстрировано, что эффективность нуклеосом-белковых взаимодействий может существенно зависеть от наличия, числа и длины линкеров [10, 11].

Дополнительным фактором, способным оказывать влияние на структуру нуклеосом, является присутствие в растворе двухвалентных катионов – в частности, катионов магния. Показано, что эти ионы влияют на структуру хроматина, увеличивая степень его конденсации, а также стабилизируют ДНК-гистоновые взаимодействия в коровой области нуклеосом [12, 13]. Анализ кристаллических структур показывает, что двухвалентные катионы

предпочтительно связываются с большой бороздкой ДНК, где они могут локально влиять на конформацию ДНК, стабилизируя ее изгибы в комплексах ДНК-белок [14]. Характер влияния ионов магния на структуру нуклеосом может также зависеть от длины линкерной ДНК [9].

Поскольку в нуклеосоме при физиологических условиях могут происходить спонтанные конформационные изменения [15], некоторые из которых важны для правильной работы генетического аппарата клетки [16], знания статической структуры этого ДНК-белкового комплекса в кристаллическом состоянии оказывается недостаточно для понимания механизмов его функционирования. Необходимо изучение конформационной динамики и структурной гетерогенности нуклеосом с использованием таких методов, как ядерный магнитный резонанс, малоугловое рентгеновское рассеяние и флуоресцентная микроскопия одиночных частиц на основе Ферсторовского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопия) [1, 6–9, 17].

В настоящей работе методом spFRET-микроскопии изучены структурные особенности укладки ДНК на октамере гистонов в нуклеосомах с двумя линкерами и без них в присутствии и в отсутствие двухвалентных ионов магния, а также в растворах с повышенной ионной силой.

Материалы и методы

Нуклеосомы были получены с помощью двух вариантов флуоресцентно-меченых ДНК-матриц, включавших в себя либо только нуклеосом-позиционирующую последовательность 603 длиной 147 п.н. (кор-нуклеосомы без линкеров, CN), либо последовательность 603 и два участка ДНК по 20 п.н. до начала и после окончания этой последовательности (нуклеосомы с двумя линкерами длиной 20 п.н., 2LN). В обоих случаях к ДНК были присоединены флуоресцентные метки Cy3 и Cy5 соответственно в положениях 13 и 91 п.н. от начала последовательности 603.

Матрицы были получены в ходе полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно-меченых праймеров CN Fw, CN Rev, 2LN Fw и 2LN Rev:

CN Fw 5'-CCCGGTTCGCGC[Cy3-dT]CCCGCCT
TCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGG-3',

CN Rev 5'-ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAG
GACGGAGGGCCTTTCAACATCGATGCACG
G[Cy5-dT]GGTTAG-3',

2LN Fw 5'-CAAGCGACACCGGCCTGGGCC
GGTTCGCGC[Cy3-dT]CCCGCCTCCGTGT
TGTCGTCTCTCGGGCGT-3',

2LN Rev 5'-GAACCATGATGGGCACTGGGTAC
CCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGG
GCCTCTTCAACATCGATGCACGG[Cy5-dT]
GGTTAG-3'

ДНК-матрицы были выделены и очищены, как было описано ранее [18]. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически. В качестве источника коровых гистонов использовали хроматин из эритроцитов цыплят без гистона H1 [2]. Сборку нуклеосом на ДНК-матрице проводили в процессе диализа против уменьшающейся концентрации NaCl по протоколу из соответствующей работы [2]. Для измерений методом spFRET-микроскопии нуклеосомы разбавляли до концентрации ~1 нМ в буфере 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 0,15 М KCl, 1 мМ β-меркаптоэтанола с добавлением 5 мМ MgCl₂ или без такового. Влияние ионной силы на структуру нуклеосом изучали в аналогичных растворах, увеличив концентрацию KCl до 0,5 или 0,7 М. Стабильность структуры нуклеосом CN и 2LN при высокой ионной силе оценивали, сравнивая результаты трех последовательных десятиминутных измерений после повышения концентрации KCl. Измерения выполняли в 12-луночной силиконовой камере (Ibidi GmbH, Германия), закрепленной на покровном стекле, с использованием конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия), как описано ранее [18]. Интенсивность флуоресценции меток Cy3 и Cy5 в составе одиночных нуклеосом регистрировали в процессе свободной диффузии частиц через фокус лазерного луча. Для каждой измеренной нуклеосомы рассчитывали коэффициент близости *K*, а для выборки строили частотное распределение нуклеосом по величине *K*, как в соответствующих работах [4, 19]. Коэффициент *K* является аналогом эффективности FRET без учета поправок на квантовые выходы флуоресценции меток Cy3 и Cy5 и на отличие в чувствительности прибора в областях флуоресценции этих меток. Распределения нуклеосом представляли в виде суперпозиции трех полос Гауссовой формы, соответствующих трем субпопуляциям нуклеосом, отличающимся по величине *K*. Согласно критерию суммы квадратов отклонений расчетных значений от экспериментальных (χ^2) наилучшее описание *K*-профилей нуклеосом было достигнуто при положениях максимумов полос 0,04, 0,62 и 0,82. При использовании для описания *K*-профилей одной Гауссовой полосы вместо двух в области значений *K*>0,2 точность разложения экспериментальных зависимостей согласно критерию χ^2 существенно снижалась. Размеры субпопуляций отличающихся по структуре нуклеосом определяли как процентное отношение площадей под отдельными Гауссовыми полосами к общей площади под *K*-профилем. Субпопуляции нуклеосом, соответствующие полосам с максимумами *K* 0,04, 0,62 и 0,82, обозначали, как LF, MF и HF (сокращения от английских low, middle и high FRET). Результаты были получены в трех независимых экспериментах. Размер выборки составлял не менее 8000 нуклеосом.

Результаты и обсуждение

Исследование методом spFRET-микроскопии показало, что в растворе нуклеосомы CN и 2LN (рисунок, А) присутствуют в виде трех субпопуляций LF, MF и HF (низкая, промежуточная и высокая эффективности FRET, соответственно), которые различаются по величине коэффициента эффективности FRET K (рисунок, Б) и, следовательно, по укладке ДНК на октамере гистонов в области расположения меток Су3 и Су5. Отметим, что метки находятся вблизи входа ДНК в нуклеосому в области, которая легче всего подвергается структурным изменениям. Минорная субпопуляция LF, описываемая Гауссовым (нормальным) распределением с максимумом 0,04, соответствует нуклеосомам с нарушенной укладкой нуклеосомной ДНК, возникающей из-за частичной (или полной) потери гистонов в разбавленных растворах. Считается, что в эту субпопуляцию могут также давать вклад нуклеосомы, в которых ДНК временно отвернута от октамера гистонов вследствие так называемого «дыхания нуклеосом» [20]. Доминирующие субпопуляции MF и HF, описываемые нормальными распределениями с расчетными максимумами 0,62 и 0,82, соответствуют, по-видимому, двум различным типам укладки супер-витков ДНК на октамере гистонов, характерным для интактных нуклеосом. Изменения в укладке ДНК могут быть вызваны близкими по свободной энергии вариантами взаимодействий между ДНК, гистонами и ионным окружением, которые отличаются расстоянием между соседними супервитками ДНК в области расположения меток при сохранении взаимодействия ДНК с гистонами, наличием локального суперскручивания двухщечечной ДНК или отличающимся на 1–2 п.н. позиционированием ДНК на октамере гистонов. Идентификация данных структурных особенностей методом spFRET-микроскопии затруднена.

K -профили интактных нуклеосом CN в присутствии и в отсутствие ионов Mg^{2+} немного отличаются (рисунок, Б). Анализ показывает, что распределение нуклеосом CN между состояниями MF и HF составляет 33:67 в растворе без ионов Mg^{2+} и 35:65 в присутствии 5 mM Mg^{2+} ($p=0,15$, различия недостоверны, рисунок, В).

Отличия K -профилей нуклеосом 2LN в растворах с ионами Mg^{2+} и без них также небольшие (рисунок, Б) и связаны с изменением распределения между состояниями MF и HF от 29:71 без Mg^{2+} до 27:73 в присутствии 5 mM Mg^{2+} ($p=0,14$, различия недостоверны, рисунок, В). Таким образом, по данным spFRET-анализа в обоих типах нуклеосом двухвалентные катионы магния вызывают лишь небольшие смещения в равновесии двух вариантов укладки ДНК в области ее входа в коровую область нуклеосомы.

Сравнительный анализ K -профилей выявил достоверные отличия нуклеосом CN и 2LN в области высоких значений K (рисунок, Б), связанные с распределением нуклеосом по состояниям MF и HF. Соотношение субпопуляций HF/MF больше у нуклеосом 2LN, чем у CN-нуклеосом, в 1,2 раза ($p=0,005$) и в 1,45 раза ($p=0,009$) соответственно в отсутствие и в присутствии ионов Mg^{2+} . По-видимому, взаимодействия положительно заряженных хвостов гистонов с линкерными участками ДНК смещают равновесие между двумя структурными состояниями в сторону HF-конформации, а двухвалентные ионы магния, имеющие тенденцию к связыванию в широкой бороздке ДНК [14, 21], снижают электростатическое отталкивание между соседними супервитками ДНК и дополнительно стабилизируют эту конформацию.

Поскольку повышение ионной силы дестабилизирует нуклеосомы и потенциально способно выявить отличия в стабильности их структуры, было проведено сравнительное изучение нуклеосом CN и 2LN при концентрации одновалентных ионов 0,5 и 0,7 M (в присутствии 5 mM Mg^{2+}).

Установлено, что повышение концентрации KCl до 0,5 M приводит к значительному увеличению субпопуляции HF по сравнению с MF у CN-нуклеосом и к противоположному эффекту у 2LN-нуклеосом (рисунок, Г, Д, Ж). В случае 2LN-нуклеосом, в отличие от CN-нуклеосом, дополнительно регистрируется небольшое увеличение субпопуляции LF (рисунок, Г). Эти структурные изменения происходят сразу после увеличения ионной силы, а в течение последующего периода наблюдения (до 30 мин) структура нуклеосом существенно не меняется (рисунок, Е).

При увеличении концентрации KCl до 0,7 M обнаружены полный переход 2LN-нуклеосом из HF- в MF-конформацию и увеличение LF-субпопуляции, а для CN-нуклеосом – значительное уменьшение HF-субпопуляции, сопровождающееся возрастанием MF-субпопуляции (рисунок, Г, Д, Ж). Установливающееся после увеличения ионной силы распределение нуклеосом по величине K стабильно в течение 30 мин наблюдения в случае 2LN-нуклеосом, но продолжает немного изменяться у CN-нуклеосом (рисунок, Е). При этом значительной дестабилизации структуры, регистрируемой как увеличение LF-субпопуляции, у CN-нуклеосом не наблюдается (рисунок, Д).

Таким образом, HF-конформация в случае 2LN-нуклеосом является неустойчивой при повышении ионной силы и, возможно, при других видах воздействий, влияющих на электростатические взаимодействия между ДНК и гистонами. MF-конформация в этих условиях оказывается более энергетически выгодной и эффективно препятствует дальнейшей реорганизации структуры нуклеосом с потерей гистонов, которая, по опублико-

ванным данным, является характерным процессом в растворах с высокой ионной силой [22, 23].

В случае CN-нуклеосом умеренное повышение ионной силы способствует стабилизации HF-конформации, что, возможно, связано с ослаблением влияния положительно заряженных хвостов гистонов на укладку нуклеосомной ДНК в отсутствие линкерных участков ДНК. Ослабле-

ние влияния может происходить вследствие усиления электростатического экранирования зарядов на ДНК и гистонах при увеличении концентрации свободных ионов. После экранирования влияния хвостов гистонов дальнейшее увеличение ионной силы способствует, как и в случае 2LN-нуклеосом, переходу CN-нуклеосом из HF- в MF-конформацию (рисунок, Д, Ж).

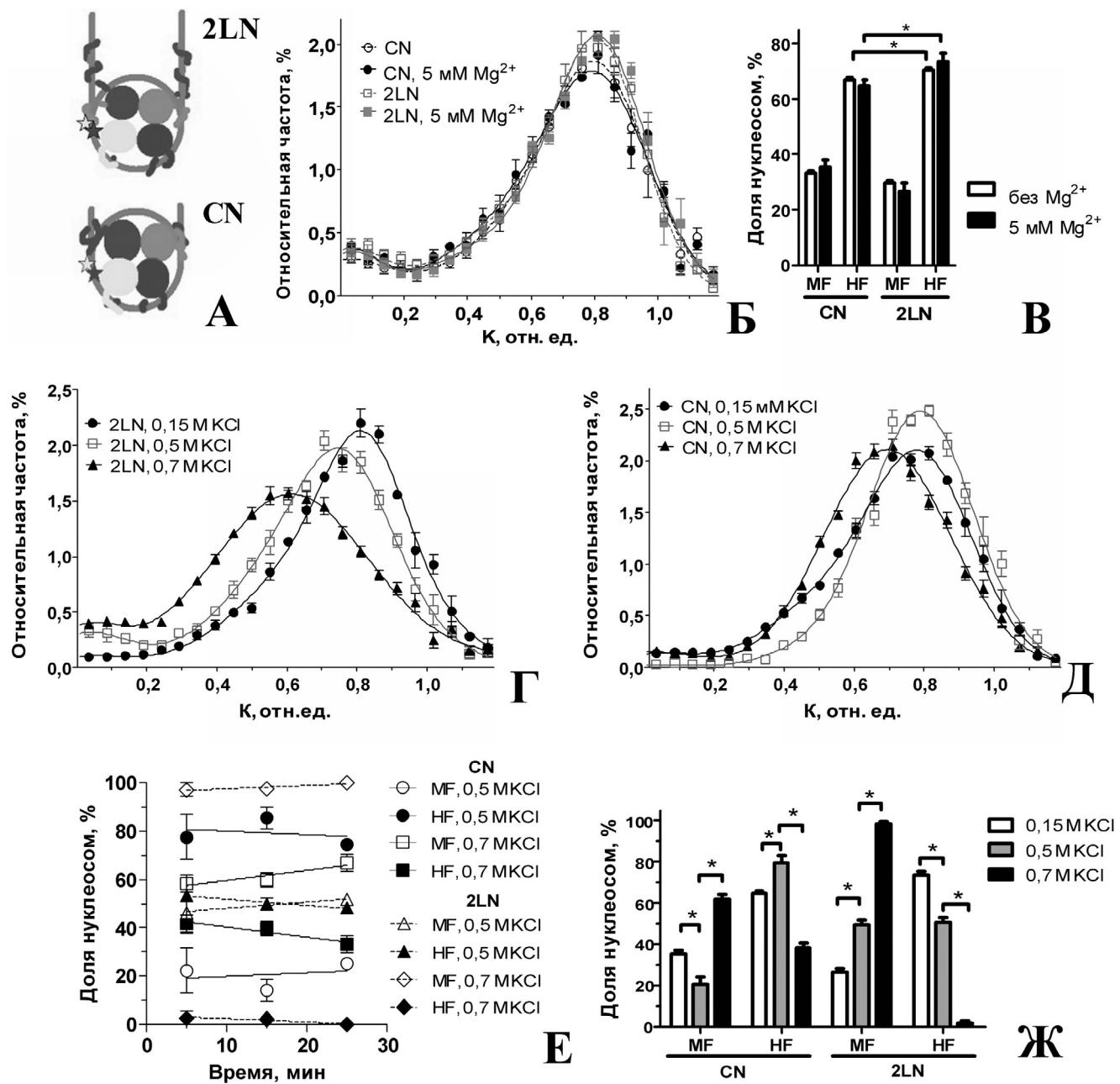


Рисунок. Влияние линкерных участков ДНК на укладку нуклеосомной ДНК в коровой области. (А) Схема структуры нуклеосом CN и 2LN и положение в них меток Cys3 и Cys5 (соответственно белая и черная звездочки). (Б) Частотные распределения нуклеосом CN и 2LN по эффективности FRET (K) при концентрации KCl 150 мМ в присутствии и в отсутствие 5 мМ Mg²⁺. (В) Гистограммы относительного содержания MF- и HF-субпопуляций нуклеосом в образцах CN и 2LN при концентрации KCl 150 мМ в присутствии и в отсутствие 5 мМ Mg²⁺ (* – $p < 0,05$). На графиках показаны средние значения ± ошибка среднего. (Г, Д) Частотные распределения для нуклеосом CN и 2LN по эффективности FRET (K) при различной ионной силе раствора в присутствии 5 мМ ионов Mg²⁺. (Е) Стабильность нуклеосом во времени при повышенной ионной силе. Представлены данные об изменениях в относительном содержании MF- и HF-субпопуляций нуклеосом в течение трех последовательных 10-минутных интервалов наблюдения после повышения ионной силы. (Ж) Гистограммы относительного содержания MF- и HF-субпопуляций нуклеосом в образцах CN и 2LN при различной ионной силе раствора в присутствии 5 мМ Mg²⁺ (* – $p < 0,05$). На графиках показаны средние значения ± ошибка среднего.

Полученные данные указывают на то, что, несмотря на сходные конформации, характерные для 2LN- и CN-нуклеосом, одни и те же факторы могут оказывать разнонаправленное влияние на структуру этих нуклеосом, что необходимо учитывать, в том числе, и при изучении взаимодействия мононуклеосом с различными ядерными белками *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou K., Gaullier G., Luger K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age // Nat. Struct. Mol. Biol. 2019. Vol. 26. N 1. P. 3–13.
2. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // Methods in Molecular Biology, vol. 523 / Eds. S. Chellappan. N.Y.: Humana press, 2009. P. 109–123.
3. Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W.H., Sen S., Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex // Science. 2004. Vol. 303. N 5656. P. 343–348.
4. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // Nat. Struct. Mol. Biol. 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
5. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015. Vol. 112. N 43. P. 5787–5795.
6. Kim J., Wei S., Lee J., Yue H., Lee T.H. Single-molecule observation reveals spontaneous protein dynamics in the nucleosome // J. Phys. Chem. B. 2016. Vol. 120. N 34. P. 8925–8931.
7. Chen Y., Tokuda J.M., Topping T., Sutton J.L., Meisburger S.P., Pabit S.A., Gloss L.M., Pollack L. Revealing transient structures of nucleosomes as DNA unwinds // Nucleic Acids Res. 2014. Vol. 42. N 13. P. 8767–8776.
8. Huang Y.C., Su C.J., Korolev N., Berezhnoy N.V., Wang S., Soman A., Chen C.Y., Chen H.L., Jeng U.S., Nordenskiöld L. The effect of linker DNA on the structure and interaction of nucleosome core particles // Soft Matter. 2018. Vol. 14. N 45. P. 9096–9106.
9. Andreeva T., Maluchenko N., Chertkov O., Studitsky V., Feofanov A., Kirpichnikov M. Length of DNA linker affects nucleosomal DNA structure // Microsc. Microanal. 2020. Vol. 26. Suppl. S2. P. 1390–1392.
10. Clark N.J., Kramer M., Muthurajan U.M., Luger K. Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. N 39. P. 32430–32439.
11. White A.E., Hieb A.R., Luger K. A quantitative investigation of linker histone interactions with nucleosomes and chromatin // Sci. Rep. 2016. Vol. 6: 19122.
12. d'Erme M., Yang G., Sheagly E., Palitti F., Bustamante C. Effect of poly(ADP-ribosylation) and Mg²⁺ ions on chromatin structure revealed by scanning force microscopy // Biochemistry. 2001. Vol. 40. N 37. P. 10947–10955.
13. Schwarz P.M., Hansen J.C. Formation and stability of higher order chromatin structures. Contributions of the histone octamer // J. Biol. Chem. 1994. N 269. N 23. P. 16284–16289.
14. Guérout M., Boittin O., Mauffret O., Etchebest C., Hartmann B. Mg²⁺ in the major groove modulates B-DNA structure and dynamics // PLoS One. 2012. Vol. 7. N 7: e41704.
15. 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.
16. Lai W.K.M., Pugh B.F. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. Vol. 18. N 9. P. 548–562.
17. Shi X., Prasanna C., Nagashima T., Yamazaki T., Pervushin K., Nordenskiöld L. Structure and dynamics in the nucleosome revealed by solid-state NMR // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2018. Vol. 130. N 31. P. 9882–9886.
18. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // Methods in Molecular Biology, vol. 1288 / Eds. S. Chellappan. N.Y.: Humana press, 2015. P. 395–412.
19. Feofanov A.V., Andreeva T.V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Reversibility of structural rearrangements in mononucleosomes induced by ionic strength // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 3. P. 157–161.
20. Buning R., Van Noort J. Single-pair FRET experiments on nucleosome conformational dynamics // Biochimie. 2010. Vol. 92. N 12. P. 1729–1740.
21. Robbins T.J., Ziebarth J.D., Wang Y. Comparison of monovalent and divalent ion distributions around a DNA duplex with molecular dynamics simulation and a Poisson-Boltzmann approach // Biopolymers. 2014. Vol. 101. N 8. P. 834–848.
22. Böhm V., Hieb A.R., Andrews A.J., Gansen A., Rocker A., Tóth K., Luger K., Langowski J. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39. N 1. P. 3093–3102.
23. Chen Y., Tokuda J.M., Topping T., Meisburger S.P., Pabit S.A., Gloss L.M., Pollack L. Asymmetric unwrapping of nucleosomal DNA propagates asymmetric opening and dissociation of the histone core // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017. Vol. 114. N 2. P. 334–339.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003). Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.05.2021 г.

После доработки 03.06.2021 г.

Принята в печать 16.06.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Influence of linker DNA on nucleosome structure according to single-particle fluorescence microscopy data

T.V. Andreeva¹, A.V. Lyubitelev¹, N.V. Malyuchenko¹, V.M. Studitsky^{1,2},
 M.P. Kirpichnikov^{1,3} , A.V. Feofanov^{1,3,*} 

¹Bioengineering Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University,
 Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA;

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997, Moscow, Russia

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Mononucleosomes assembled using DNA templates of various lengths that contain a nucleosome-positioning sequence are widely used in molecular biological studies, but their structural features require detailed investigation. The single-particle fluorescence microscopy based on the Förster resonance energy transfer was used to compare the structure of nucleosomes with two 20 bp length DNA linkers and core-nucleosomes without linkers (CN) in solutions containing 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂ (or without MgCl₂), as well as in solutions with increased ionic strength (0.5 and 0.7 M KCl). It was found that these nucleosomes are present in solutions as two dominant subpopulations, which differ in the DNA folding on the histone octamer. It was revealed that CN and 2LN differ in the ratio of these subpopulations, and the differences increase in the presence of Mg²⁺ ions. With an increase in the ionic strength, conformational reorganizations occur in the core region of the nucleosomes. The character of the reorganizations differs in 2LN and CN at 0.5 M KCl, but becomes similar at 0.7 M KCl. The obtained data indicate that, despite the similar conformations of 2LN and CN, the same factors can induce different effect on the structure of these nucleosomes, and it should be taken into account when, for example, studying the interactions of mononucleosomes with various nuclear proteins *in vitro*.

Keywords: nucleosome structure, influence of ions, fluorescence, microscopy, single molecule, conformational changes

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-74-30003.

Сведения об авторах

Андреева Татьяна Викторовна – аспирантка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: andreeva.tatyana.2014@post.bio.msu.ru

Любителев Александр Викторович – мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91, e-mail: varanus-salvator@yandex.ru

Малюченко Наталья Валерьевна – канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, Тел 8 495-938-00-05, e-mail: mal_nat@mail.ru

Студитский Василий Михайлович – докт. биол. наук, проф. Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: +1-888-369-2427; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Кирпичников Михаил Петрович – акад., проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8170-1607>

Феофанов Алексей Валерьевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 615.015

Влияние ингибиторов циклооксигеназы эторикоксиба и диклофенака натрия, а также их комбинаций с мексидолом на поведение крыс

Е.А. Иванова* , **А.И. Матюшкин** , **А.Г. Васильчук** , **Т.А. Воронина** 

Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

**e-mail: iwanowaea@yandex.ru*

Изучено влияние нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) – селективного ингибитора циклооксигеназы (ЦОГ)-2 эторикоксиба и неселективного ингибитора ЦОГ диклофенака натрия – на поведение крыс при однократном пероральном введении в дозах 1 и 10 мг/кг, и оценен их эффект в комбинации с антиоксидантным препаратом сукцинатом 2-этил-6-метил-3-оксиридиана (мексидолом). Установлено, что оба ингибитора ЦОГ в дозе 10 мг/кг снижают двигательную активность крыс в teste «Открытое поле», а селективный ингибитор ЦОГ-2 (10 мг/кг) еще и увеличивает длительность иммобилизации животных в teste подвешивания за хвост. Применение эторикоксиба и диклофенака натрия в малой дозе (1 мг/кг) совместно с мексидолом в дозе 25 мг/кг, в которой препарат усиливает противовоспалительный эффект изучаемых ингибиторов ЦОГ, не приводит к развитию отклонений поведения, подобных зарегистрированным при введении НПВП в дозе 10 мг/кг. Более того, использование ингибиторов ЦОГ (1 мг/кг) в комбинации с мексидолом (25 мг/кг) вызывает повышение двигательной активности крыс. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности дальнейшего исследования влияния препаратов с антиоксидантным действием на выраженность основных и побочных эффектов НПВП, особенно при их курсовом применении.

Ключевые слова: диклофенак натрия, эторикоксиб, мексидол, двигательная активность, тест подвешивания за хвост, крысы

Более 284 млн человек в мире страдают тревожными расстройствами, более 264 млн человек – депрессией и более 45 млн человек – биполярным расстройством [1]. Схемы традиционной фармакологической коррекции заболеваний, сопровождающихся психическими и невротическими расстройствами, часто бывают недостаточно эффективны, поэтому изучение подходов к повышению эффективности фармакотерапии этих нозологий не теряет своей значимости. В качестве одного из них рассматривается применение противовоспалительных средств, так как известно, что в патогенез как тревожных состояний, так и депрессивных расстройств вовлечено воспаление.

Воспалительный каскад как звено в патогенезе тревожных расстройств запускается при различной стрессовой активации. С одной стороны, длительное воздействие стрессовых факторов, являющихся источником страха и тревоги при посттравматическом стрессовом расстройстве, генерализованном тревожном расстройстве, паническом расстройстве и фобиях, приводит к сопровождающейся увеличением продукции цитокинов стимуляции клеток иммунной системы как на перифе-

рии, так и в центральной нервной системе [2]. С другой стороны, выраженная стресс-индуцированного воспаления модулируется гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (ГГНС) и автономной нервной системой. Однако если активация ГГНС с последующей секрецией глюкокортикоидов в ответ на стрессовое воздействие обычно приводит к предупреждению развития воспалительной реакции за счет ингибирования NF-кБ-сигналинга [3], то увеличение концентрации норадреналина вследствие стрессового влияния стимулирует NF-кБ, который запускает реакцию иммунной системы с увеличением продукции цитокинов [4]. Следовательно, можно полагать, что хронические патологические процессы, при которых снижается активность ГГНС и в противовес повышается активность симпатической нервной системы, сопровождаются воспалением [2].

К связанным со стрессом психическим расстройствам, при которых развивается глюкокортикоидная резистентность, относятся большое депрессивное расстройство и биполярное расстройство [5]. При большом депрессивном рас-

стройстве наблюдается увеличение симпатического тонуса [6], а у страдающих им пациентов, переживших стрессовые ситуации в раннем возрасте, в ответ на психосоциальный стресс повышаются концентрация интерлейкина-6 (IL-6) в плазме крови и связывание NF-кБ с ДНК периферических мононуклеаров, причем уровни этих маркеров коррелируют с тяжестью заболевания [7]. Синтез IL-6 стимулирует образующийся в каскаде арахидоновой кислоты простагландин E₂ [8], уровень которого, по данным некоторых исследований, коррелирует с тяжестью симптомов большого депрессивного расстройства [9, 10]. В экспериментах на мышах IL-6 усиливает метаболизм серотонина в мозге животных [11], а в клинических исследованиях зарегистрировано повышение эффективности терапии депрессий селективными ингибиторами обратного захвата серотонина у пациентов, принимающих ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ)-2 [12, 13]. Кроме того, известно, что валпроаты, карбамазепин и препараты лития снижают метаболизм арахидоновой кислоты [14]. Однако идея о снижении метаболизма арахидоновой кислоты как о подходе к терапии аффективных и тревожных расстройств не находит однозначных подтверждений. Так, установлено, что хотя у пациентов с впервые выявленными опухолями, принимавших в течение года до постановки диагноза ацетилсалициловую кислоту в малой дозе (20–150 мг в сутки), снижен риск развития тревожных, депрессивных и других обусловленных стрессом расстройств, прием иных нестериоидных противовоспалительных препаратов (НПВП), напротив, увеличивает риск возникновения таких расстройств [15].

Целью настоящего исследования были сравнение влияния НПВП – селективного ингибитора ЦОГ-2 эторикоксиба и неселективного ингибитора ЦОГ диклофенака натрия – на поведение крыс при однократном пероральном введении, а также оценка изменения поведения животных при введении комбинаций этих НПВП с мексидолом. Мексидол (сукиннат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина) – разработанный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова антиоксидантный препарат, обладающий, наряду с другими эффектами, свойством усиливать способность ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса к связыванию [16, 17]. Экспериментально установлено, что применение мексидола в комбинации с диклофенаком натрия и эторикоксибом усиливает выраженность противовоспалительного действия этих НПВП [18].

Материалы и методы

Животные. В работе использовали половозрелых аутбредных белых крыс-самцов массой 220–240 г, полученных из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Науч-

ный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская область, Россия). Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, и правилами, утвержденными этической комиссией НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Каждая экспериментальная группа включала 10–12 животных.

Изучаемые препараты. Диклофенак натрия (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) и эторикоксиб (Merck Sharp & Dohme B.V., Нидерланды) применяли в дозах 1 и 10 мг/кг; мексидол (ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», Россия) – в дозе 25 мг/кг; использовали комбинации НПВП в дозе 1 мг/кг и мексидола в дозе 25 мг/кг; растворителем служил физиологический раствор. Выбор доз НПВП и используемого в комбинации с ними мексидола обусловлен тем, что в этих дозах НПВП, как и НПВП в комбинации с мексидолом проявляют противовоспалительный эффект в методике каррагенанового отека лапы у крыс [18]. Изучаемые препараты, их комбинации и физиологический раствор (контрольной группе) вводили перорально за 1 ч до регистрации поведения животных в методиках «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», а также в тесте подвешивания за хвост.

Тест «Открытое поле». Поведение крыс регистрировали в течение 3 мин в установке «Открытое поле» (НПК «Открытая Наука», Россия). Установка представляет собой камеру диаметром 90 см с бортиком высотой 38 см. Пол арены расчерчен на 19 секторов, которые располагаются в 3 ряда (ряд секторов на периферии, сектора средней части арены и центральный сектор), и имеет 13 отверстий по 4 см. Регистрировали горизонтальную двигательную активность крыс на периферии и в центральной зоне поля (за центральную зону принимали сектора в средней части поля и центральный сектор), вертикальную двигательную активность (стойки), число обследованных отверстий, эпизодов груминга и количество болюсов [19].

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт». Установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК «Открытая Наука», Россия) представляет собой крестообразную арену с двумя открытыми и двумя закрытыми (высота стенок закрытых рукавов 30 см) рукавами длиной 50 см и шириной 14 см, расположенную на тележке высотой 55 см. В течение 5 мин наблюдения за по-

ведением животных в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» регистрировали время, проведенное крысами на центральной площадке, в открытых и закрытых рукавах, а также число заходов в открытые и закрытые рукава установки [19].

Тест подвешивания за хвост в модификации для крыс [20] является моделью поведения отчаяния, основанной на том, что кратковременный неизбежаемый стресс провоцирует иммобилизацию животных. Крысы были подвешены за хвост с помощью клейкой ленты на расстоянии 58 см над полом. Время (в секундах) иммобилизации (за состояние иммобилизации принимали такое состояние, когда крысы висели без каких-либо движений) животных регистрировали каждые 3 мин в течение 6 мин наблюдения.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с помощью свободной программной среды вычислений R версии 4.0.4. Нормальность распределения данных проверяли критерием Шапиро-Уилка с последующей оценкой межгруппового равенства дисперсий критерием Бартлетта. Так как распределение в выборках отличалось от нормального, использовали критерий Краскела-Уоллиса, являющийся непараметрической альтернативой однофакторного дисперсионного анализа. В том случае, если рассчитанное значение критерия Краскела-Уоллиса превышало критическое, различия показателей считали статистически значимыми. В случае обнаружения статистически значимых различий между группами дополнительно проводили парное сравнение выборок при помощи апостериорного критерия Данна. Для сравнения значений времени иммобилизации в тесте подвешивания за хвост в двух временных точках у одних и тех же животных использовали парный критерий Вилкоксона. Результаты представляли в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1–Q3). Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния НПВП и их комбинаций с мексидолом на ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность крыс в teste «Открытое поле» свидетельствуют о том, что нет значимых отличий поведения крыс, которым вводили НПВП в дозе 1 мг/кг или мексидол в дозе 25 мг/кг, от поведения контрольных животных. Однако повышение дозы как селективного ингибитора ЦОГ-2, так и неселективного ингибитора ЦОГ до 10 мг/кг приводило к двукратному снижению горизонтальной двигательной активности крыс на периферии установки по сравнению с показателем контрольных животных. Добавление в комбинацию к НПВП в дозе 1 мг/кг мексидола в дозе 25 мг/кг,

при однократном введении в которой препарат не проявляет активности, но усиливает противовоспалительное действие диклофенака натрия и эторикоксиба, повышает двигательную активность крыс. Так, сумма пересеченных границ секторов пола установки крысами, которым вводили комбинации диклофенака натрия или эторикоксиба с мексидолом, соответственно на 28,9% и 20% больше, чем значение этого показателя в контрольной группе. При этом горизонтальная двигательная активность групп крыс, которым вводили комбинации НПВП и мексидола, была выше, чем в группах животных, которым вводили только НПВП. Так, при введении крысам комбинации диклофенака натрия в дозе 1 мг/кг и мексидола по сравнению с введением только диклофенака натрия в дозе 1 мг/кг горизонтальная активность на периферии установки повысилась на 29,4%, суммарная горизонтальная активность – на 38%. Различия этих показателей при введении неселективного ингибитора ЦОГ в дозе 10 мг/кг и комбинации диклофенака натрия в дозе 1 мг/кг с мексидолом были более выражены: при введении комбинации горизонтальная активность крыс на периферии установки была в 2,2 раза выше, суммарная горизонтальная активность – в 2,4 раза выше. В группе животных, которым вводили комбинацию эторикоксиба в дозе 1 мг/кг и мексидола, горизонтальная двигательная активность на периферии установки была на 22,2% выше, чем в группе крыс, которым вводили только эторикоксиб в дозе 1 мг/кг, и в 2,5 раза – по сравнению с группой животных, получавших эторикоксиб в дозе 10 мг/кг. Кроме того, суммарная горизонтальная двигательная активность животных, получавших комбинацию эторикоксиба и мексидола, была в 2,5 раза выше, чем в группе крыс, которым вводили эторикоксиб в дозе 10 мг/кг (таблица 1).

В teste «Приподнятый крестообразный лабиринт», в котором уровень испытуемого животными стресса выше по сравнению с тестом «Открытое поле», животные контрольной группы практически весь период наблюдения (Me – 287 с, Q1 – 272 с, Q3 – 293 с) демонстрировали характерное для крыс рефлекторное избегание освещенных открытых рукавов установки и предпочтение затемненных стенками закрытых рукавов (норковый рефлекс). Время, проведенное в закрытых рукавах установки, в группах крыс, которым вводили изучаемые НПВП, мексидол в дозе 25 мг/кг и комбинации НПВП в дозе 1 мг/кг с мексидолом, практически не отличалось от показателя контрольной группы, что свидетельствует об отсутствии их влияния на тревожность животных. По показателям числа заходов в открытые и закрытые рукава установки, а также времени нахождения на центральной площадке статистически значимых различий между группами не зафиксировано.

Таблица 1

Влияние диклофенака натрия, эторикоксиба и их комбинаций с мексидолом при однократном пероральном введении на поведение крыс в teste «Открытое поле», Me (Q1–Q3)

Группа	Горизонтальная активность, пересечения границ секторов, ед.			Вертикальная активность, ед.	Число эпизодов груминга, ед.	Число обследованных норок, ед.	Число болюсов, ед.
	На периферии	В центральной части арены	Сумма пересечений				
Контроль, физ.р-р	22,5 (19,5–24,8)	0,0 (0,0–0,5)	22,5 (21,8–25,5)	5,0 (3,5–9,0)	1,0 (0,5–3,0)	5,0 (4,0–9,0)	3,0 (1,0–4,0)
Мексидол 25 мг/кг	19,0 (17,0–24,0)	0,0 (0,0–1,0)	20,0 (17,0–26,0)	8,0 (7,0–12,0)	1,0 (1,0–3,0)	5,0 (3,0–9,0)	3,0 (2,0–4,0)
Диклофенак 1 мг/кг	18,0 (9,0–21,8) #	0,0 (0,0–1,0)	18,0 (9,8–23,5) #	5,0 (4,8–8,5)	1,5 (0,8–2,3)	4,5 (2,0–6,3)	3,5 (0,0–4,0)
Диклофенак 10 мг/кг	11,5 (8,5–14,0)*#	0,0 (0,0–1,0)	12,0 (9,5–15,5) #	5,5 (3,8–8,3)	1,0 (0,8–1,3)	3,5 (2,5–5,0)	3,5 (0,0–4,0)
Диклофенак 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг	25,5 (22,0–31,0)	1,0 (0,0–2,3)	29,0 (22,8–31,0)*	6,5 (3,5–9,3)	0,5 (0,0–1,3)	5,0 (3,0–7,3)	2,5 (0,0–3,3)
Эторикоксиб 1 мг/кг	21,0 (12,3–24,3) #	0,0 (0,0–1,3)	21,5 (12,8–25,5)	7,5 (6,0–11,0)	1,5 (1,0–2,3)	8,0 (3,8–11,0)	1,5 (0,0–3,3)
Эторикоксиб 10 мг/кг	11,0 (9,5–16,5)*#	0,0 (0,0–0,0)	11,0 (9,5–16,5) #	8,0 (5,0–9,0)	1,0 (0,0–3,0)	5,0 (3,0–7,0)	1,0 (0,0–2,3)
Эторикоксиб 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг	27,0 (22,0–31,0)	0,0 (0,0–1,0)	27,0 (22,0–31,0)*	7,0 (5,0–11,0)	1,0 (0,0–2,0)	6,0 (5,0–11,0)	1,0 (0,0–3,0)

Примечания: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Данна;

– $p \leq 0,05$ по сравнению с соответствующей комбинацией НПВП и мексидола, критерий Данна;

физ.р-р – физиологический раствор

При оценке влияния препаратов на поведение отчаяния (иммобилизацию) крыс в teste подвешивания за хвост установлено, что его длительность у животных контрольной группы во вторые 3 мин регистрации возрастает на 77,8% ($p < 0,05$, парный критерий Вилкоксона). Хотя при введении НПВП и их комбинаций с мексидолом такого выраженного увеличения длительности иммобилизации во второй временной интервал регистрации (относительно первых 3 мин регистрации) не наблюдалось, НПВП и их комбинации с мексидолом не снижали ее. Более того, при введении селективного ингибитора ЦОГ-2 эторикоксиба в дозе 10 мг/кг время поведения отчаяния крыс значительно возросло как в первые (на 64,8%), так и во вторые (на 39,6%) 3 мин регистрации по сравнению с контрольной группой при увеличении медианы его длительности за 6 мин наблюдения на 42,5%. Значимость отличий при введении эторикоксиба в дозе 10 мг/кг по всем трем зарегистрированным времененным показателям была отмечена не только по сравнению с контрольной группой, но и по сравнению с группой животных, которым вводили эторикоксиб в дозе 1 мг/кг. Время иммобилизации при введении этого НПВП в дозе 10 мг/кг было больше на 61,8%, 61,4% и 51,4% соответственно за первые, вторые 3 мин и суммарные 6 мин наблюдения по сравнению с этими показателями при его введении в дозе 1 мг/кг. При этом значимое увеличение длительности поведения отчаяния при введении эторикоксиба в дозе 10 мг/кг по сравнению с длительностью поведения отчаяния в группе животных, которым вводили комбинацию эторикоксиба в дозе 1 мг/кг и мексидола, было зарегистрировано за первые 3 мин его регистрации (на 36,9%) и суммарно за 6 мин наблюдения (на 24,6%). Не-

обходимо отметить, что хотя в группах крыс, которым вводили диклофенак натрия, не зарегистрировано значимых отличий от показателей контрольной группы, длительность иммобилизации при его введении в дозе 10 мг/кг была значительно выше, чем при введении препарата в дозе 1 мг/кг – время иммобилизации за 6 мин увеличивалось на 20,9%. Кроме того, при введении диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг зарегистрировано значимое увеличение времени иммобилизации по сравнению с временем иммобилизации в группе крыс, которым вводили комбинацию диклофенака с мексидолом, за вторые 3 мин наблюдения (на 64,9%) и за 6 мин суммарно (на 28,5%) (таблица 2).

Таким образом, в настоящем исследовании не выявлено влияния диклофенака натрия и эторикоксиба в дозах 1 и 10 мг/кг (однократно, перорально), в которых они оказывают противовоспалительное действие на модели острого экссудативного воспаления – каррагенанового отека лапы – у крыс [18], на тревожность животных. Однако изученные НПВП в дозе 10 мг/кг снижают двигательную активность, а эторикоксиб, кроме того, в этой дозе увеличивает длительность поведения отчаяния животных в teste подвешивания за хвост.

Известно, что неселективный ингибитор ЦОГ индометацин при однократном введении в дозе 10 мг/кг (внутрибрюшинно, введение осуществлялось за 60 мин до тестирования) вызывает повышение уровня тревожности, регистрируемого в методике «Открытое поле» по показателю «коэффициент ориентированочно-исследовательских реакций» (сумма значений горизонтальной и вертикальной активности, а также числа обследованных отверстий) у мышей линии Balb/c [21]. Однако этот эффект индометацина связывают не

Таблица 2

Влияние диклофенака натрия, эторикоксиба и их комбинаций с мексидолом при однократном пероральном введении на поведение крыс в teste подвешивания за хвост, Me (Q1–Q3)

Группа	Время иммобилизации, с		
	первые 3 мин	вторые 3 мин	за 6 мин
Контроль, физ.р-р	54,0 (53,0–72,0)	96,0 (84,5–102,5)	153,0 (142,0–169,0)
Мексидол 25 мг/кг	73,5 (62,5–89,3)	95,5 (71,3–97,8)	165,0 (151,5–207,20)
Диклофенак 1 мг/кг	60,0 (49,0–83,5)	87,0 (54,5–112,0)	153,0 (119,5–174,0) #
Диклофенак 10 мг/кг	83,0 (75,8–94,3)	110,5 (95,5–119,8)	185,0 (167,8–219,8)
Диклофенак 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг	64,0 (49,5–76,0)	67,0 (51,0–89,0) #	144,0 (118,5–159,5) #
Эторикоксиб 1 мг/кг	55,0 (46,5–83,8) #	83,0 (75,8–105,8) #	144,0 (124,0–185,20) #
Эторикоксиб 10 мг/кг	89,0 (81,0–111,0)*	134,0 (113,5–140,0)*	218,0 (198,0–242,0)*
Эторикоксиб 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг	65,0 (37,5–77,0) #	99,0 (90,5–118,5)	175,0 (143,5–185,0) #

Примечания: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Данна;

– $p \leq 0,05$ по сравнению с соответствующим НПВП в дозе 10 мг/кг, критерий Данна

с его влиянием на ЦОГ, а со способностью препарата ингибировать синтез позитивного модулятора ГАМК_A-рецепторов аллопрегнанолона (5 α -прегнан-3 α -ол-20-она) [21]. В условиях модели 21-дневного хронического непредсказуемого стресса у крыс селективный ингибитор ЦОГ-2 целекоксиб при хроническом введении дозозависимо (2–16 мг/кг) ослабляет выраженную депрессивноподобного поведения, регистрируемого в teste предпочтения раствора сахара, снижает повышенные экспрессию ЦОГ-2 и концентрацию простагландина Е₂ в головном мозге животных и при хроническом, но не остром введении в дозе 16 мг/кг проявляет анксиолитические свойства [22]. В нескольких клинических исследованиях установлено, что применение НПВП, за исключением ацетилсалicyловой кислоты в низкой дозе, наоборот, повышает риск возникновения депрессий [15, 23]. Применение НПВП пациентами, перенесшими инсульт, снижает риск раннего возникновения депрессий (в течение года после инсульта), но повышает риск возникновения депрессий спустя год и более после диагностированного инсульта [24]. Возможным объяснением этих клинических данных являются экспериментально полученные подтверждения того, что ингибирование ЦОГ в головном мозге может усиливать нейровоспаление [25].

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что применение мексидола, способного за счет антиоксидантных свойств, но не влияния на ЦОГ усиливать противовоспалительное действие изученных НПВП, в комбинации с ними в дозе 1 мг/кг не приводит к снижению двигательной активности крыс, регистрируемому при введении диклофенака натрия и эторикоксиба в дозах 10 мг/кг, и к увеличению длительности поведения отчаяния животных в teste подвешивания за хвост. При этом при введении комбинаций НПВП и мексидола двигательная активность животных была выше по сравнению с двигательной активностью как в кон-

трольной группе, так и в группах крыс, которым вводили НПВП в малой дозе. Это дает основания предполагать, что применение мексидола совместно с НПВП позволит корректировать влияние ингибиторов ЦОГ на поведение. Однако потребуется дальнейшее изучение курсового применения препаратов с учетом того, что препараты этой фармакотерапевтической группы пациенты с хроническими заболеваниями принимают длительно и в ряде случаев даже пожизненно.

Таким образом, в проведенном исследовании установлено, что селективный ингибитор ЦОГ-2 эторикоксиб и неселективный ингибитор ЦОГ диклофенак натрия при однократном пероральном введении в дозе 10 мг/кг оказывают влияние на эмоционально-двигательное поведение крыс: оба препарата снижают двигательную активность животных, а при применении селективного ингибитора ЦОГ-2 у животных зарегистрировано увеличение длительности поведения отчаяния в teste подвешивания за хвост. Использование этих препаратов в малой дозе (1 мг/кг) совместно с мексидолом в дозе 25 мг/кг, в которой препарат не проявляет противовоспалительного и анксиолитического действия, но усиливает противовоспалительный эффект НПВП до уровня, регистрируемого при введении в дозе 10 мг/кг, не приводит к развитию отклонений поведения, подобных зарегистрированным при введении НПВП в дозе 10 мг/кг. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности дальнейшего исследования влияния препаратов с антиоксидантным действием и мексидола, в частности, на выраженность основных и побочных эффектов НПВП, особенно при их курсовом применении.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме № 0521-2019-0007. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены этическим комитетом НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray C.J.L., Afshin A., Alam T., et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // Global Health Metrics. 2018. Vol. 392. N 10159. P. 1789–1858.
2. Michopoulos V., Powers A., Gillespie C.F., Ressler K.J., Jovanovic T. Inflammation in fear- and anxiety-based disorders: PTSD, GAD, and Beyond // Neuropsychopharmacol. 2017. Vol. 42. N 1. P. 254–270.
3. Rhen T., Cidlowski J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs // New Engl. J. Med. 2005. Vol. 353. N 16. P. 1711–1723.
4. Bierhaus A., Wolf J., Andrassy M., et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003. Vol. 100. N 4. P. 1920–1925.
5. Merkulov V.M., Merkulova T.I., Bondar N.P. Mechanisms of brain glucocorticoid resistance in stress-induced psychopathologies // Biochemistry. 2017. Vol. 82. N 3. P. 351–365.
6. Raison C.L., Lowry C.A., Rook G.A. Inflammation, sanitation, and consternation: loss of contact with coevolved, tolerogenic microorganisms and the pathophysiology and treatment of major depression // Arch. Gen. Psychiat. 2010. Vol. 67. N 12. P. 1211–1224.
7. Pace T.W., Metzko T.C., Alagbe O., Musselman D.L., Nemerooff C.B., Miller A.H., Heim C.M. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress // Am. J. Psychiat. 2006. Vol. 163. N 9. P. 1630–1633.
8. Portanova J.P., Zhang Y., Anderson G.D., Hauser S.D., Masferrer J.L., Seibert K., Gregory S.A., Isakson P.C. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin-6 production *in vivo* // J. Exp. Med. 1996. Vol. 184. N 3. P. 883–891.
9. Nishino S., Ueno R., Ohishi K., Sakai T., Hayaishi O. Salivary prostaglandin concentrations: possible state indicators for major depression // Am. J. Psychiat. 1989. Vol. 146. N 3. P. 365–368.
10. Ohishi K., Ueno R., Nishino S., Sakai T., Hayaishi O. Increased level of salivary prostaglandins in patients with major depression // Biol. Psychiat. 1988. Vol. 23. N 4. P. 326–334.
11. Wang J., Dunn A.J. Mouse interleukin-6 stimulates the HPA axis and increases brain tryptophan and serotonin metabolism // Neurochem. Int. 1998. Vol. 33. N 2. P. 143–154.
12. Akhondzadeh S., Jafari S., Raisi F., Nasehi A.A., Ghoreishi A., Salehi B., Mohebbi-Rasa S., Raznahan M., Kamalipour A. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: A double blind and placebo controlled trial // Depress. Anxiety. 2009. Vol. 26. N 7. P. 607–611.
13. Müller N., Schwarz M.J., Dehning S., Douhe A., Cerovecki A., Goldstein-Müller B., Spellmann I., Hetzel G., Maino K., Kleindienst N., Möller H.-J., Arolt V., Riedel M. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: Results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine // Mol. Psychiatr. 2006. Vol. 11. N 7. P. 680–684.
14. Rapoport S.I. Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease // Prostag. Leukot. Ess. 2008. Vol. 79. N 3–5. P. 153–156.
15. Hu K., Sjölander A., Lu D., Walker A.K., Sloan E.K., Fall K., Valdimarsdóttir U., Hall P., Smedby K.E., Fang F. Aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs and depression, anxiety, and stress-related disorders following a cancer diagnosis: a nationwide register-based cohort study // BMC Med. 2020. Vol. 18. N 1: 238.
16. Voronina T.A., Seredenin S.B. Analysis of the mechanism of psychotropic action of 3-hydroxypyridine derivative // Ann. I. Super. Sanita. 1988. Vol. 24. N 3. P. 461–466.
17. Воронина Т.А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия // Фарматека. 2009. Т. 180. № 6. С. 28–31.
18. Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Vasilchuk A.G., Voronina T.A. Ability of mexidol to enhance antiexudative effect of diclofenac sodium and etoricoxib in rats and mice with carrageenan-induced edema // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2021. Vol. 76. N 2. P. 46–51.
19. Воронина Т.А., Середенин С.Б., Яркова М.А., Воронин М.В. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятиян, А.Н. Васильева и др. М.: Изд-во ФГБУ НЦЭМСП Минздравсоцразвития России, 2012. С. 264–275.
20. Chermat R., Thierry B., Mico J.-A., Stéru L., Simon P. Adaptation of the tail suspension test to the rat // J. Pharmacol. 1986. Vol. 17. N 3. P. 348–350.
21. Шимишт А.А., Калинина Т.С., Воронина Т.А. Изучение влияния диазепама на тревожные реакции у мышей, вызванные индометацином // Рос. биотер. журн. 2012. Т. 11. № 1. С. 45–46.
22. Guo J.Y., Li C.-Y., Ruan Y.-P., Sun M., Qi X.-L., Zhao B.-S., Luo F. Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain // Eur. J. Pharmacol. 2009. Vol. 612. N 1–3. P. 54–60.
23. Kessing L.V., Rytgaard H.C., Gerds T.A., Berk M., Ekström C.T., Andersen P.K. Newdrug candidates for depression – a nationwide population-based study // Acta Psychiatr. Scand. 2019. Vol. 139. N 1. P. 68–77.
24. Wium-Andersen I.K., Wium-Andersen M.K., Jørgensen M.B., Osler M. Anti-inflammatory treatment and risk for depression after first-time stroke in a cohort of 147487 Danish patients // J Psychiatr. Neurosci. 2017. Vol. 42. N 5. P. 320–330.
25. Aid S., Langenbach R., Bosetti F. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase2 // J. Neuroinflamm. 2008. Vol. 5: 17.

Поступила в редакцию 27.05.2021 г.

После доработки 05.07.2021 г.

Принята в печать 07.07.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Effect of cyclooxygenase inhibitors etoricoxib and diclofenac sodium as well as their combinations with mexidol on behavior in rats

E.A. Ivanova* , A.I. Matyushkin , A.G. Vasilchuk , T.A. Voronina 

Zakusov Institute of Pharmacology, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

*e-mail: iwanowaea@yandex.ru

The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor etoricoxib and non-selective COX inhibitor diclofenac sodium, on the behavior of rats was evaluated with a single oral administration at doses of 1 and 10 mg/kg individually and in combination with 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate (mexidol). Both COX inhibitors at a dose of 10 mg/kg decrease locomotor activity in the open field test, and the selective COX-2 inhibitor at a dose of 10 mg/kg also increases the duration of immobility of animals in the tail suspension test. The use of etoricoxib and diclofenac sodium at a low dose (1 mg/kg) with mexidol at a dose of 25 mg/kg, in which the latter enhances the anti-inflammatory effect of the COX inhibitors, does not lead to behavioral deviations similar to those associated with the NSAIDs at a dose of 10 mg/kg. Moreover, combinations of COX inhibitors (1 mg/kg) and mexidol (25 mg/kg) increase the locomotor activity of rats. This justifies further research of the effect of antioxidants on the severity of the main and side effects of NSAIDs, especially when administered as a course.

Keywords: *diclofenac sodium, etoricoxib, mexidol, locomotor activity, tail suspension test, rats*

Funding: This study was performed under the state assignment of Zakusov Institute of Pharmacology, project number 0521-2019-0007.

Сведения об авторах

Иванова Елена Анатольевна – канд. фарм. наук, ст. науч. сотр. лаборатории психофармакологии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: iwanowaea@yandex.ru; ORCID: <https://0000-0003-4961-2051>

Матюшкин Александр Иванович – мл. науч. сотр. лаборатории психофармакологии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: matyushkin.alex@gmail.com; ORCID: <https://0000-0001-7640-0551>

Васильчук Анастасия Геннадьевна – мл. науч. сотр. лаборатории психофармакологии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: jimlev@mail.ru; ORCID: <https://0000-0002-9079-1322>

Воронина Татьяна Александровна – проф., докт. мед. наук, зав. лабораторией психофармакологии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: voroninata38@gmail.ru; ORCID: <https://0000-0002-0200-5097>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.322

Молекулярное моделирование HR2- и трансмембранных доменов префузионного S-белка вируса SARS-CoV-2

М.Е. Боздагянин^{1,2} , Ф.С. Орехов^{1,3} , Д.С. Литвинов¹, В.Н. Новоселецкий^{1,*} 

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

² Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семёнова, Российской академии наук, Россия, 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4;

³ Институт персонализированной медицины, Сеченовский университет, Россия, 119435, г. Москва, Большая Пироговская ул., д. 2, стр. 4

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

Вирус SARS-CoV-2, вызывающий коронавирусную инфекцию COVID-19, остается в фокусе исследований по всему миру. Проникновение этого вируса в клетку начинается со связывания его S-белка с ангиотензин-превращающим ферментом 2, экспрессированным на клеточной поверхности. Изучение происстранственной структуры S-белка необходимо для понимания молекулярных аспектов его функционирования. В настоящее время экспериментальными методами хорошо изучено строение почти всей молекулы S-белка, за исключением его эндодомена, трансмембранных домена и прилегающих к нему остатков эктодомена. В работе выполнено молекулярное моделирование структуры фрагмента S-белка, соответствующего его суперспиральному HR2-домену и полностью пальмитоилированному трансмембральному домену. Стабильность модели подтверждена расчетами молекулярной динамики в полноатомном и крупнозернистом представлении в липидном бислое. Показано, что пальмитоилирование приводит к существенному снижению подвижности трансмембранного домена и локальному утолщению бислоя. Это может иметь значение для процесса тримеризации белка.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, SARS-CoV-2, S-белок, липидный бислон, пальмитоилирование, тримерная супер-спираль

Продолжающаяся пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, вступила в фазу третьей волны. Во всем мире предпринимаются усилия по разработке вакцин и лекарств для преодоления общемирового кризиса. Основной мишенью большинства вакцин является поверхностный S-белок вируса, играющий ключевую роль в проникновении вирусных частиц в клетки хозяина за счет связывания с человеческим ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2).

S-белок состоит из двух субъединиц – S1 и S2, которые расщепляются по сайту Arg685-Ser686 клеточной фуриновой протеазой. Субъединица S1 содержит сигнальный пептид, N-концевой домен и рецептор-связывающий домен, которые взаимодействуют с АПФ2-рецептором. Субъединица S2 включает пептид слияния, гептадные повторы 1 и 2 (HR1 и HR2), трансмембранный домен (ТМД) и эндодомен. Полноразмерный мембранный S-белок, пространственная структура которого до настоящего момента не установлена, образует гомотримерный комплекс и обеспечивает слияние мембран хозяина и вирусной частицы, а впоследствии и проникновение вируса [1].

Огромный объем структурной информации доступен для эктодомена S-белка – первичной мишени иммунной системы, но гораздо меньше известно о его ТМД и проксимальных участках вблизи мембраны [2]. Считается, что конформационная подвижность S-белка преимущественно обусловлена изгибами в нескольких шарнирных областях, одной из которых является участок между HR2 и ТМД [3]. Поскольку конформационная подвижность играет ключевую роль в процессе проникновения вируса, а также может влиять на доступность эпитопов антител на поверхности S-белка, построение аккуратной модели фрагмента S-белка, включающего ТМД и соседние домены, является важной задачей.

В настоящем исследовании мы построили структурную модель фрагмента S-белка, содержащую ТМД и прилегающие к нему домен HR2 с внешней стороны мембраны и фрагмент эндодомена с ее внутренней стороны, включая домен, обогащенный цистеинами (cys). Методами молекулярной динамики (МД) в модельной мембране сложного состава в полноатомном и крупнозернистом представлении мы оптимизировали

построенную модель и оценили влияние пальмитоилирования цистеинов на подвижность S-белка в мемbrane и его локальное липидное окружение.

Материалы и методы

Сборка и параметризация полноатомной модели. Модель структуры фрагмента S-белка коронавируса SARS-CoV-2 (включающего остатки 1157–1256, т.е. домен HR2, ТМД и домен C-terminus) с канонической последовательностью (Uniprot P0DTC2) построена с помощью программы Modeller [4] на основании гомологии по шаблонам двух структур с кодами PDB 2fxp [5] и 6e8w [6].

Протокол полноатомной молекулярной динамики. Подготовка модели к проведению расчета МД выполнена с помощью веб-сервиса CHARMM-GUI [7], причем остатки цистеина 1235, 1236, 1241, 1242, 1244, 1248, 1249, 1251, 1254, 1255 были пальмитоилированы (рис. 1, А). Липидный состав мембраны был выбран, как описано ранее [8]: холестерин : пальмитоилсфингомиelin (ПСМ) : пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (ПОФЭ) : дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДПФЭ) : пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (ПОФХ) : пальмитоилолеоилфосфатидилсерин (ПОФС) : дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) : дипальмитоилфосфатидилсерин (ДПФС) как 15:10:9:6:3:3:2:2. Финальное соотношение молекул липидов после пальмитоилирования составило 88:54:51:36:18:18:12:11 соответственно. Общий размер системы с учетом молекул воды (модель TIP3P) и ионов Na^+ и Cl^- (0,15 M) составил 176246 атомов. Размер ячейки составил $90\text{\AA} \times 90\text{\AA} \times 215\text{\AA}$. Минимизация энергии системы и уравновешивание были выполнены по протоколу, рекомендуемому веб-сервисом CHARMM-GUI, а именно: 1) минимизация методом наискорейшего спуска длительностью 5000 шагов; 2) шесть стадий уравновешивания длительностью 150–250 пс с заданием скоростей атомов в начальный момент времени в соответствии с распределением Максвелла при 318 К и с постепенным ослаблением гармонических ограничений на положение тяжелых атомов. Расчет МД выполнен с помощью программы Gromacs [9] в полноатомном силовом поле CHARMM36m [10] в ансамбле NPT при температуре 318 К в течение 30 нс.

Параметризация крупнозернистой модели и протокол крупнозернистой молекулярной динамики. Начальные модели для расчетов крупнозернистой МД с применением силового поля MARTINI 2.2 [11] были созданы с помощью сценария martinize.py на базе собранной полноатомной модели. Для пальмитоилирования белка использовался программный сценарий, доступный по адресу <https://github.com/porekhov/palmitoylize>. Молекулярная топология для пальмитоилированного остатка цистеина была взята из ранее

опубликованной работы группы Тильмана [12]. Модели пальмитоилированного и непальмитоилированного тримера были погружены в модельный бислой, аналогичный по составу использованному в полноатомных расчетах, и сольватированы (использовалась стандартная модель для воды в поле MARTINI и ионы Na^+ и Cl^- в концентрации 0,15 M) с помощью сценария insane.py. Протокол МД был выбран в соответствии с рекомендациями из работы группы Марринка [13]; расчеты проводились в NPT-ансамбле при температуре 318 К. Шаг интегрирования был выбран равным 20 фс. Для обеих систем были получены траектории длиной 1 мкс. Расчеты также проводились в Gromacs 2019.4 [9]. Для расчета толщины бислоя и площади, приходящейся на липид, использовалась программа g_lomero [14]. Для расчета радиальных функций распределения использовались сценарии Python, использующие библиотеку MDAnalysis.

Результаты и обсуждение

Построение модели. Моделируемый фрагмент S-белка состоит из нескольких сегментов с разной степенью структурной упорядоченности (рис. 1, А). Моделирование домена HR2 не представляет затруднений, поскольку известна структура аналогичного домена близкородственного S-белка коронавируса SARS-CoV (идентичность по остаткам 1157–1210 составляет 100%) (PDB ID 2fxp, [5]). Спирали мономеров ориентированы таким образом, что к сердцевине этого домена направлены гидрофобные остатки I1172, I1179, L1186, L1193, L1200.

В то же время для ТМД S-белка в настоящее время нет шаблонов с высокой идентичностью, поэтому, исходя из тримерного α -спирального строения и обогащенности N-конца ТМД ароматическими остатками, в качестве шаблона нами был выбран ТМД оболочечного белка gp41 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (идентичность по остаткам 1211–1240 составляет 20%, в т.ч. 33% по остаткам 1211–1225, и 7% по остаткам 1226–1240). На данный момент известно несколько заметно различающихся структур этого домена или его фрагментов (PDB ID 6e8w [6], 5jup [15], 6b3u [16]), что делает затруднительным выбор одной из них в качестве шаблона. Кроме того, неопределенной остается конформация остатков 1205–1210, поскольку соответствующие остатки шаблона имеют неупорядоченную структуру. Одной из возможных конформаций является α -спираль, и в этом случае HR2-домен и ТМД составляли бы единую суперспираль [3]. Однако такая конформация оказывается стерически невыгодной, поскольку многочисленные ароматические остатки в последовательности S-белка оказываются расположеными со всех сторон α -спиралей и таким образом затрудняют их супер-

спирализацию. В итоге мы остановили свой выбор на шаблоне б6w, хотя и имеющем необычную для ТМД структуру [6] с изломом в α -спиралях и протяженными 3–10-спиралями, зато позволяющим расположить объемные боковые цепи ароматических остатков без перекрываний и нарушения винтовой симметрии суперспирали. На оси суперспирали при этом оказываются остатки Y1209, I1216, G1223, V1230, M1237. Построенная в данном исследовании модель (рис. 1, А; слева) ТМД S-белка коронавируса SARS-CoV-2 демонстрирует заметное локальное сходство со структурой фрагмента S-белка коронавируса SARS-CoV (PDB ID 2run), полученной ранее [17]. Отклонение по С-атомам 11 центральных остатков составляет менее 1 Å, и многие боковые цепи имеют близкую ориентацию.

Вопрос пальмитоилирования вирусных мембранных белков изучается уже около 40 лет [18].

В настоящее время принято считать, что пальмитоилированию подвергаются практически все остатки цистеина на C-конце ТМД и в cys-домене S-белка коронавирусов, включая SARS-CoV [19]. По этой причине представляется неоправданным сделанный в работе Ву с соавт. [8] выбор структуры плексина (PDB ID 515k), также обогащенного остатками цистеина, связанными большим числом дисульфидных связей, в качестве шаблона для моделирования cys-домена S-белка коронавируса SARS-CoV-2. При построении нашей модели мы исходили из того, что все остатки цистеина (по 10 в каждой цепи) пальмитоилированы. Итоговая структура модели показана на рис. 1, А (слева).

Полноатомная молекулярная динамика. Выбор силового поля CHARMM36m обусловлен его широким применением для изучения динамики как белков со слабоупорядоченными областями, так и для белок-мембранных систем [10]. Кроме того,

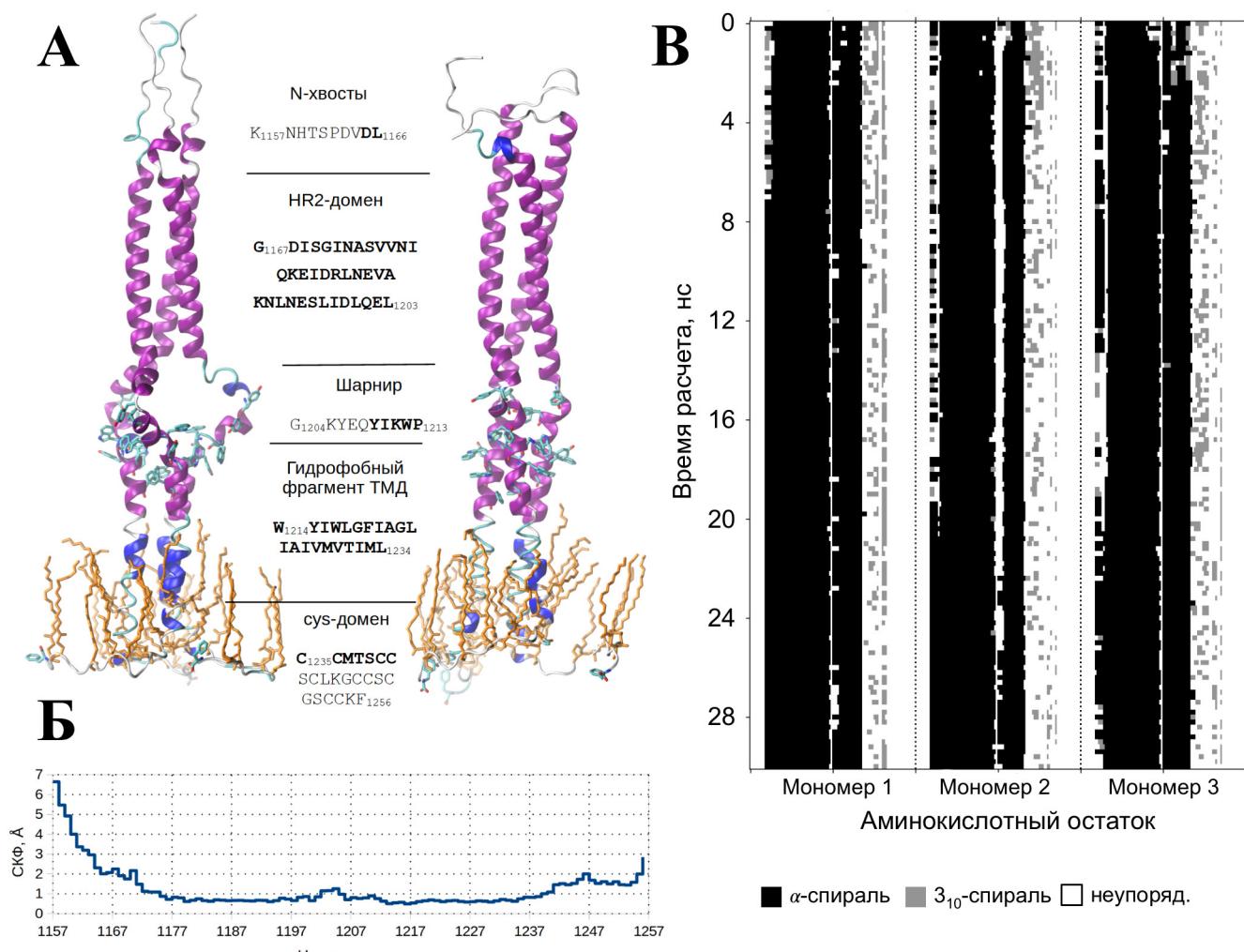


Рис. 1. А: Модель структуры фрагмента S-белка коронавируса SARS-CoV-2 (домен HR2 и ТМД, остатки 1157–1256) до молекулярной динамики (слева) и после (справа). α -Спиралы показаны фиолетовым, 3–10-спиралы – синим, остатки пальмитоила – оранжевым. Ароматические остатки показаны в стержневом представлении. В последовательности полужирным выделены спиральные остатки. Б: Среднеквадратичная флуктуация (СКФ) С-атомов остатков моделируемого фрагмента S-белка на заключительном этапе расчета МД (20–30 нс). В: Изменения вторичной структуры фрагмента S-белка в ходе МД в полноатомном представлении. По вертикальной оси – время расчета, по горизонтальной – аминокислотные остатки трех мономеров. Каждая точка диаграммы отображает вторичную структуру индивидуального остатка в конкретный момент расчета.

использование данного силового поля позволяет более точно воспроизводить конформацию экспериментально определенных структур, в т.ч. коротких мембранных белков, не представляющих собой идеальные α -спирали [20].

Выполненный расчет полноатомной МД показывает, что структура белка претерпевает ряд значительных изменений. Отметим в связи с этим, что до момента расшифровки полной структуры белка представленные на рис. 1, А границы являются в известном смысле условными. Так, например, веб-сервис TMHMM [21] предсказывает, что остатки 1214–1234 (рис. 1, А) располагаются в гидрофобном слое мембраны. Однако предварительный расчет МД показал, что размещение объемных ароматических остатков (W1214YIWLGF1220) в этом слое мембраны оказывается стерически невыгодным и этот фрагмент «всплывает» в область полярных головок внешнего слоя липидов, одновременно вовлекая внутрь гидрофобного слоя мембраны часть остатков суб-домена из области полярных головок внутреннего слоя. В то же время известно, что неупорядоченная вторичная структура не характерна для остатков трансмембранных фрагментов белков, что позволяет предположить наличие спиральной структуры и у следующих за L1234 остатков. В пользу удлиненного спирально-го ТМД говорят и структуры мономера (PDB ID 6b3u, [16]) и тримеров (PDB ID 5jyn [15] и 6e8w [6]) ТМД оболочечного белка gp41 ВИЧ, имеющие длину спиралей более 30 остатков. Исходя из этого сопоставления, в нашей модели спиральный фрагмент простирается до остатка C1241, и общая длина каждой трансмембранный спирали составляет 34 остатка.

В ходе МД N-хвосты в целом сохранили свое неупорядоченное строение (рис. 1, А; справа) и продемонстрировали высокую подвижность (рис. 1, Б). Однако можно заметить частичное упорядочивание остатков N-хвостов с образованием α -спиралей (рис. 1, В), что согласуется со спиральной конформацией остатков на С-конце ряда структур эктодомена S-белка (PDB ID 6xr8 и др.). Напротив, суперспиральное состояние HR2-домена оказалось очень стабильным, а наибольшая подвижность наблюдается на его границах. Шарнирный фрагмент коренным образом меняет свою конформацию, однако тепловые флуктуации атомов относительно невелики. Трансмембранный домен в целом сохраняет свою спиральную структуру, включая конформационно напряженные 3–10-спирали, наблюдаемые в структуре шаблона (PDB ID 6e8w). Для трансмембранных спиралей, как правило, не характерны большие флуктуации и модель, предложенная в настоящей работе, не является исключением. Наконец, суб-домен, несмотря на пальмитоилирование и тесное взаимодействие с мембраной, продемонстрировал в среднем довольно высокую подвижность за счет,

главным образом, относительно подвижных замыкающих остатков K1256 и F1256. Здесь же отметим, что остатки пальмитоила, присоединенные к остаткам C1235 и C1236, демонстрируют поведение, отличающееся от поведения аналогичных остатков, присоединенных к другим остаткам цистеина. Указанные остатки цистеина в нашей модели принадлежат ТМД и заметно заглублены в мембрану. Это приводит к тому, что присоединенные к ним ацильные цепи по геометрическим соображениям оказываются способны проникать во внешний слой липидов мембраны, в то время как ацильные цепи остальных остатков пальмитоила не способны к этому и совершают флуктуации исключительно в пределах внутреннего слоя липидов. В этой связи интересно отметить, что ранее методами масс-спектрометрии было установлено [22], что остатки цистеина на С-конце ТМД гемагглютинина вируса гриппа А подвергаются, скорее, не собственно пальмитоилированию, а стеарилированию. Наши наблюдения показывают, что положение остатков цистеина на С-конце ТМД S-белка также допускает их стеарилирование, в то время как присоединение более длинной алифатической цепи приведет к локальному разупорядочиванию мембранныго окружения. Таким образом, результаты МД показывают, что именно стеарилирование остатков цистеинов в ТМД S-белка является наиболее вероятным вариантом посттрансляционной модификации этих остатков в природных условиях.

Благодаря наличию слабоструктурированного (в начальный момент) шарнира, домен HR2 может совершать колебания относительно ТМД, однако их амплитуда невелика. Угол между доменами на протяжении траектории меняется незначительно, достигая 20° в первые 10 нс, снижаясь по мере структурирования шарнира на протяжении последующих 10 нс до 5° и сохраняясь на таком уровне в дальнейшем.

Интересно сопоставить наши результаты с ЯМР-анализом ТМД S-белка (остатки 1209–1237) [23], который имеет аминокислотную последовательность, отличающуюся от канонической (Uniprot ID P0DTC2): в позициях 1229 и 1233 последовательность имеет остатки Leu вместо Met, а в позициях 1235–1237 –последовательность Ser-Ser-Thr вместо Cys-Cys-Met. Авторам не удалось определить строение N-конца ТМД (остатки 1209–1217), обогащенного ароматическими остатками, в то время как остатки 1218–1237 образуют тример из практически параллельных α -спиралей, однако межспиральные контакты совершенно отличаются от ранее изученных тримеров (PDB ID 5jyn, 6e8w и др.) [23]. Авторы обнаружили, что сердцевина тримера образована четырьмя неполярными остатками сходного размера I1221, I1225, L1229 и L1233, обеспечивающими стабильность всего тримера в целом. Однако такое

взаиморасположение спиралей вызывает вопросы при переходе к канонической последовательности, в которой два из этих четырех остатков являются остатками метионина и которая замыкается трипептидом Cys-Cys-Met. Во-первых, более крупные остатки метионина будут нарушать плотную упаковку сердцевины тримера, выявленную с помощью ЯМР. Во-вторых, из геометрических соображений следует, что по крайней мере один из этой пары остатков цистеина (а также один из следующей пары C1240-C1241) будет также ориентирован в сердцевину и его пальмитоилирование будет поэтому затруднено или невозможно. Таким образом, предложенная на основе анализа ЯМР модель ТМД плохо согласуется с нативной конформацией S-белка.

Отметим также вероятную роль пальмитоилирования в поддержании структурной стабильности ТМД S-белка. Как упоминалось выше, часть спиралей ТМД (рис. 1, А) представлена напряженными 3–10-спиралями, которые довольно редко встречаются в мембранных белках. Нами был выполнен предварительный расчет МД непальмитоилированного ТМД S-белка, в результате которого 3–10-спирали превратились в более стабильные α -спирали, что нарушило структуру тримера (данные не приведены). В случае МД пальмитоилированного ТМД превращения 3–10-спиралей в α -спирали не происходит (рис. 1, А, В). Таким образом, можно констатировать, что пальмитоилирование ограничивает конформационную подвижность спиралей в ТМД и стабилизирует структуру этого домена. Косвенным подтверждением такой роли пальмитоилирования являются экспериментальные данные о большей важности пальмитоилирования остатков цистеина, расположенных в начале сис-домена [24]. Согласно нашей модели, эти остатки принадлежат ТМД и их пальмитоилирование препятствует конформационному переходу 3–10-спиралей в α -спирали.

Крупнозернистая молекулярная динамика. Для выяснения влияния пальмитоилирования остатков цистеина на локальное липидное окружение ТМД были проведены дополнительные исследования пальмитоилированного и непальмитоилированного белка в крупнозернистом приближении, встроенного в мембрану аналогичного состава, что позволило увеличить время моделирования до 1 мкс.

Для обеих систем была рассчитана локальная толщина бислоя мембранны (рис. 2, А). Видно, что наличие остатков пальмитоила приводит к локальному утолщению и искривлению мембранны вокруг белка (черная область вокруг белой, соответствующей белку; рис. 2, А). Усредненная локальная площадь, приходящаяся на липид, со встроенным пальмитоилированным (слева) и непальмитоилированным (справа) тримером показа-

на на рис. 2, Б. Липиды вокруг белка упакованы плотнее, чем в остальной области мембранны. Кроме того, были дополнительно рассчитаны радиальные функции распределения представленных в мембране липидов относительно центра масс ТМД в плоскости мембранны в двух системах (рис. 2, Д–З). Из результатов следует, что пальмитоилирование белка практически не влияет на распределение в мембране холестерина (рис. 2, Д) и ряда других липидов (ДПФС, ДПФХ, ДПФЭ, ПСМ, графики не показаны), в то время как значения радиальной функции распределения для ПОФЭ и ПОФС (рис. 2, Е–З) вблизи непальмитоилированного белка оказываются выше, чем вблизи пальмитоилированного, т.е. мембрана в области ТМД становится обогащенной ПОФЭ и ПОФС. Для ПОФХ наблюдается обратный эффект – вероятность обнаружить этот липид вблизи пальмитоилированного белка существенно выше по сравнению с непальмитоилированным. Таким образом, пальмитоилирование приводит к значительному перераспределению типов липидов в реалистичной многокомпонентной модели бислоя. В совокупности с наблюдающимися утолщением мембранны и уменьшением площади, приходящейся на липид, вблизи пальмитоилированного белка это может свидетельствовать о формировании в его окрестности липидного микродомена, напоминающего рафт. Эти наблюдения также хорошо согласуются эффектами пальмитоилирования, представленными в работе Шароле и ван-дер-Гут [25]: пальмитоилы могут увеличивать эффективную гидрофобную длину ТМД белка, увеличивая толщину прилегающего бислоя липидов и способствуя ассоциации с упорядоченными липидами.

В процессе МД HR2-домен тримера S-белка наклоняется относительно ТМД (рис. 2, Б–Г) аналогично тому, как это происходило в полноатомном моделировании, что хорошо соотносится с максимумом распределения углов в районе 20° и значительной долей конформаций с углом между доменами вплоть до 0° (т.е. полностью «выпрямленной» конформации). Кроме того, наличие остатков пальмитоила незначительно уменьшает амплитуду изгиба S-белка. Отчасти это может быть связано с тем, что вокруг ТМД белка сформировался более плотный и толстый слой мембранны, приводящий к снижению его подвижности.

Рассчитанные коэффициенты латеральной диффузии пальмитоилированного и непальмитоилированного белка, $D_{\text{+пальмитоил.}} = 0,0205 \pm 0,0004 \cdot 10^{-5}$ и $D_{\text{-пальмитоил.}} = 0,0025 \pm 0,0001 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$, свидетельствуют о том, что пальмитоилирование на порядок замедляет движение белка в латеральной плоскости мембранны. Можно предположить, что подобное замедление способствует стабилизации тримера ТМД S-белка.

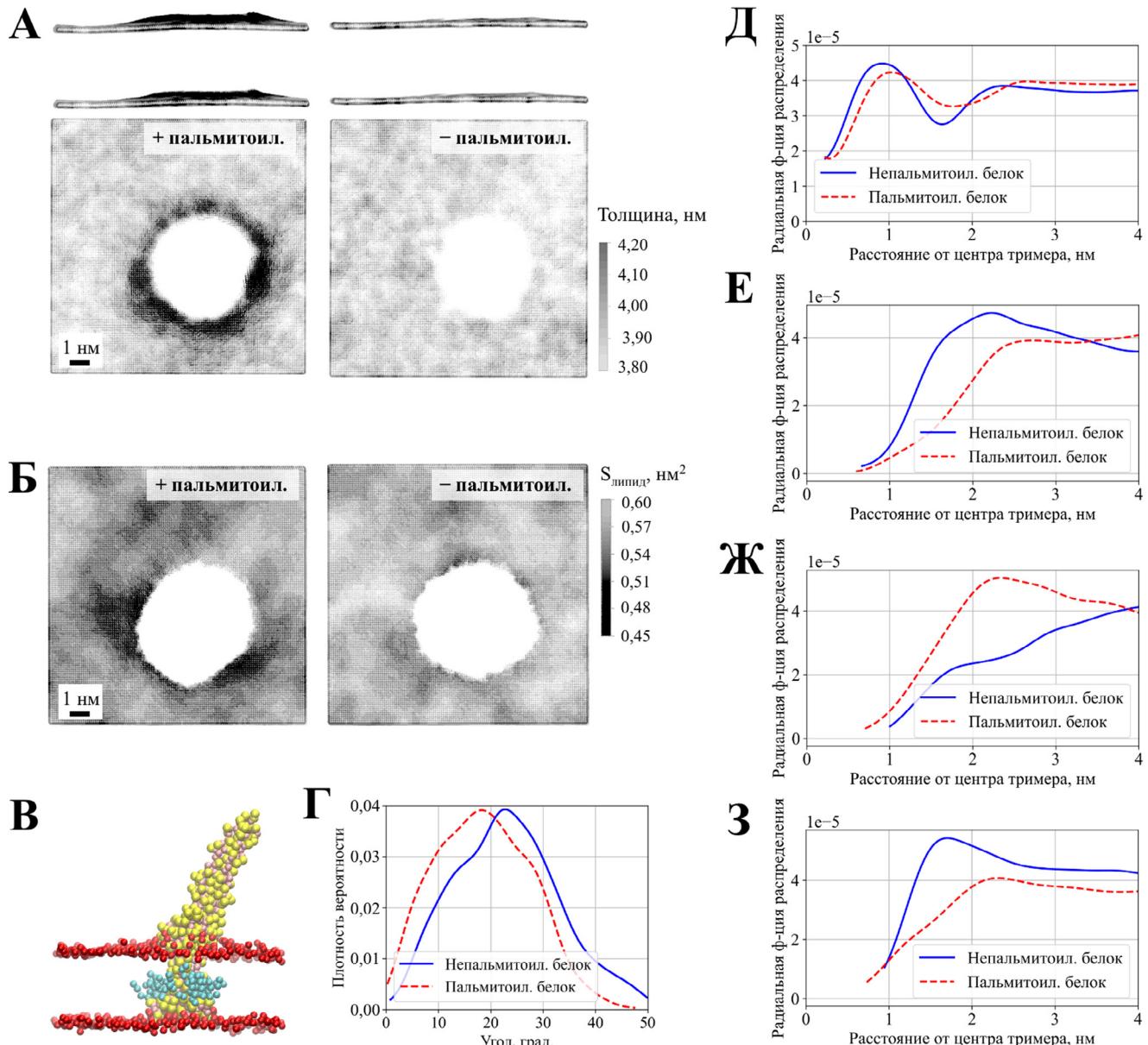


Рис. 2. Крупнозернистое моделирование тримера в модельной липидной мембране. А: локальная толщина бислоя со встроенным пальмитоилированным (слева) и непальмитоилированным (справа) тримером. Показан вид бислоя сбоку и сверху. Б: усредненная локальная площадь, приходящаяся на липид, со встроенным пальмитоилированным (слева) и непальмитоилированным (справа) тримером. В: репрезентативный кадр из траектории МД пальмитоилированного тримера (частицы белка показаны серыми и желтыми сферами, остатки пальмитоила – циановыми) с наклоненным относительно ТМД внешним доменом. В мембране показаны только крупнозернистые частицы, соответствующие фосфатной группировке липидов (красные сферы); Г: распределение значений угла наклона HR2-домена по отношению к ТМД. Д–З: радиальные функции распределения холестерина, ПОФЭ, ПОФХ и ПОФС соответственно, рассчитанные относительно центра масс ТМД в плоскости мембранны.

Таким образом, в нашем исследовании была впервые построена трехмерная модель ТМД и HR2-домена S-белка, учитывающая пальмитоилирование цистеинов. Встроенная в мембрану сложного состава модель белка была оптимизирована, ее стабильность оценена методами МД в полноатомном и крупнозернистом приближениях. Было показано, что конформационная подвижность HR2-ТМД-фрагмента обеспечивается изгибом по шарнирной области на границе двух доменов. Нами также было показано, что пальмитоилирование ТМД приводит к локальным изменениям в бислое (его утолщению

и уплотнению, а также перераспределению ряда липидов), напоминающим формирование рафтоподобного микродомена. Полученную в работе модель можно использовать в дальнейших исследованиях при интерпретации структурных данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60258). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Letko M., Marzi A., Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses // *Nat. Microbiol.* 2020. Vol. 5. N 4. P. 562–569.
2. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein // *Cell.* 2020. Vol. 181. N 2. P. 281–292.e6.
3. Turoňová B., Sikora M., Schürmann C., et al. *In situ* structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges // *Science.* 2020. Vol. 370. N 6513. P. 203–208.
4. Webb B., Sali A. Protein structure modeling with MODELLER // *Structural Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2199 / Eds. Y.W. Chen and C.P.B. Yiu. N.Y.: Humana, P. 239–255.
5. Hakansson-McReynolds S., Jiang S., Rong L., Caffrey M. Solution structure of the severe acute respiratory syndrome-coronavirus heptad repeat 2 domain in the prefusion state // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. N 17. P. 11965–11971.
6. Fu Q., Shaik M.M., Cai Y., Ghantous F., Piai A., Peng H., Rits-Volloch S., Liu Z., Harrison S.C., Seaman M.S., Chen B., Chou J.J. Structure of the membrane proximal external region of HIV-1 envelope glycoprotein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018. Vol. 115. N 38. P. E8892–E8899.
7. Jo S., Kim T., Iyer V.G., Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM // *J. Comput. Chem.* 2008. Vol. 29. N 11. P. 1859–1865.
8. Woo H., Park S.J., Choi Y.K., Park T., Tanveer M., Cao Y., Kern N.R., Lee J., Yeom M.S., Croll T.I., Seok C., Im W. Developing a fully glycosylated full-length SARS-CoV-2 spike protein model in a viral membrane // *J. Phys. Chem. B.* 2020. Vol. 124. N 33. P. 7128–7137.
9. Abraham M.J., Murtola T., Schultz R., Pall S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX.* 2015. Vol. 1–2. P. 19–25.
10. Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., de Groot B., Grubmüller H., MacKerell A.D. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins // *Nat. Methods.* 2017. Vol. 14. N 1. P. 71–73.
11. de Jong D.H., Singh G., Bennett W.F.D., Arnarez C., Wassenaar T.A., Schäfer L.V., Periole X., Tieleman D.P., Marrink S.J. Improved parameters for the Martini coarse-grained protein force field // *J. Chem. Theory Comput.* 2013. Vol. 9. N 1. P. 687–697.
12. Atsmon-Raz Y., Tieleman D.P. Parameterization of palmitoylated cysteine, farnesylated cysteine, geranylgeranylated cysteine, and myristoylated glycine for the Martini force field // *J. Phys. Chem. B.* 2017. Vol. 121. N 49. P. 11132–11143.
13. de Jong D.H., Baoukina S., Ingolfsson H.I., Marrink S.J. Martini straight: Boosting performance using a shorter cutoff and GPUs // *Comput. Phys. Commun.* 2016. Vol. 199. P. 1–7.
14. Gapsys V., de Groot B.L., Briones R. Computational analysis of local membrane properties // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2013. Vol. 27. N 10. P. 845–858.
15. Dev J., Park D., Fu Q., Chen J., Ha H.J., Ghantous F., Herrmann T., Chang W., Liu Z., Frey G., Seaman M.S., Chen B., Chou J.J. Structural basis for membrane anchoring of HIV-1 envelope spike // *Science.* 2016. Vol. 353. N 6295. P. 172–175.
16. Chiliveri S.C., Louis J.M., Ghirlando R., Baber J.L., Bax A. Tilted, uninterrupted, monomeric HIV-1 gp41 transmembrane helix from residual dipolar couplings // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. Vol. 140. N 1. P. 34–37.
17. Mahajan M., Bhattacharya S. Solution structure of pre transmembrane domain. Worldwide Protein Data Bank, 2014. DOI: 10.2210/pdb2RUN/pdb.
18. Veit M. Palmitoylation of virus proteins // *Biol. Cell.* 2012. Vol. 104. N 9. P. 493–515.
19. Petit C.M., Chouljenko V.N., Iyer A., Colgrove R., Farzan M., Knipe D.M., Kousoulas K.G. Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion // *Virology.* 2007. Vol. 360. N 2. P. 264–274.
20. Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E.M., Mittal J., Feig M., MacKerell A.D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone φ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Vol. 8. N 9. P. 3257–3273.
21. Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E.L.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 305. N 3. P. 567–580.
22. Serebryakova M.V., Kordyukova L.V., Baratova L.A., Markushin S.G. Mass spectrometric sequencing and acylation character analysis of C-terminal anchoring segment from Influenza A hemagglutinin // *Eur. J. Mass Spectrom.* 2006. Vol. 12. N 1. P. 51–62.
23. Fu Q., Chou J.J. A trimeric hydrophobic zipper mediates the intramembrane assembly of SARS-CoV-2 spike // *bioRxiv.* 2021. DOI: 10.1012/jacs.1c02394.
24. Thorp E.B., Boscarino J.A., Logan H.L., Goletz J.T., Gallagher T.M. Palmitoylations on murine coronavirus spike proteins are essential for virion assembly and infectivity // *J. Virol.* 2006. Vol. 80. N 3. P. 1280–1289.
25. Charollais J., Van Der Goot F.G. Palmitoylation of membrane proteins (Review) // *Mol. Membr. Biol.* 2009. Vol. 26. N 1. P. 55–66.

Поступила в редакцию 25.05.2021 г.

После доработки 22.06.2021 г.

Принята в печать 24.06.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Molecular modeling of HR2 and transmembrane domains of the SARS-CoV-2 S-protein in the prefusion state

M.E. Bozdaganyan^{1,2} , P.S. Orekhov^{1,3} , D.S. Litvinov¹, V.N. Novoseletsky^{1,*} 

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

²*N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
Kosygina 4, Moscow, 119991, Russia;*

³*Institute of Personalized Medicine, Sechenov University, Bolshaya Pirogovskaya 2–4, 119435 Moscow, Russia
e-mail: novoseletsky@mail.bio.msu.ru

The SARS-CoV-2 virus causes the coronavirus infection COVID-19 and remains in the focus of the researchers around the world. The penetration of the SARS-CoV-2 virus into the cell begins with the binding of its S-protein to the angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) expressed on the cell surface. The study of the spatial structure of the S-protein is necessary for the understanding of the molecular aspects of its functioning. At present, the structure of almost the entire S-protein molecule has been well studied by experimental methods, with the exception of its endodomain, transmembrane domain, and adjacent ectodomain residues. We performed molecular modeling of the structure of the S-protein fragment corresponding to its supercoiled HR2 domain and fully palmitoylated transmembrane domain. The stability of the model in the lipid bilayer is confirmed by means of molecular dynamics simulations in full-atomic and coarse-grained representation. It was shown that palmitoylation leads to a significant decrease in the mobility of the transmembrane domain and local thickening of the bilayer, which may be important for the process of protein trimerization.

Keywords: *molecular modeling, SARS-CoV-2, S-protein, lipid bilayer, palmitoylation, trimeric coiled coil*

Funding: The research was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project number 20-04-60258.

Сведения об авторах

Боздаганян Маринэ Евгеньевна – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: bozdaganyan@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1647-1627>

Орехов Филипп Сергеевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: orekhov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4078-4762>

Литвинов Даниил Сергеевич – студент биологического факультета МГУ (магистерская программа «Структурная биология»). Тел.: 8-495-939-57-38; daniilllitvinov997@gmail.com

Новоселецкий Валерий Николаевич – канд. физ.-мат. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: novoseletsky@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4090-4859>

МНЕНИЕ

УДК 612.67:573.7

Тестостерон и продолжительность жизни, или почему женщины живут дольше мужчин. Гипотеза

А.В. Куликов* , Л.В. Архипова

*Лаборатория клеточно-тканевых механизмов компенсации функций биообъектов,
Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Российской академии наук,
Россия, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3
e-mail: 29.04.55@mail.ru

Женщины во всем мире живут дольше мужчин. Вопрос, почему это происходит, является очень интересным, но все еще не решенным в геронтологии. Существует ряд предложений для объяснения механизмов, лежащих в основе этого феномена, но четко подтвержденных или опровергнутых среди них пока нет. Вероятно, это связано с тем, что крайне сложно организовать проверку подобных гипотез на *Homo sapiens*, а имеющиеся данные по животным часто противоречивы и их результаты нельзя в полной мере переносить на человека. В статье мы попытались обозначить один из возможных механизмов, приводящих к половым различиям продолжительности жизни в популяции человека. Угнетающее влияние тестостерона на иммунную систему женщин значительно слабее, чем на иммунную систему мужчин. Концентрация тестостерона в крови мужчин выше, чем у женщин, в 10–18 раз, а после наступления менопаузы и без того малая концентрация тестостерона у женщин падает еще на 25–50%. В большей степени ослабевающая с возрастом иммунная система мужчин приводит к увеличению заболеваемости инфекционными, онкологическими и другими иммунозависимыми патологиями, что и снижает минимальную, среднюю и максимальную продолжительность их жизни по сравнению с женщинами.

Ключевые слова: продолжительность жизни, тимус, тестостерон, иммунная система, карцинация, трансплантация

Во всех странах вне зависимости от расовой или религиозной принадлежности женщины в среднем живут дольше мужчин [1–3]. Существует множество попыток объяснить данное явление: от утверждения, что мужчины больше потребляют спиртного, больше курят, испытывают более тяжелые физические нагрузки, чаще рискуют, у них доминируют факторы, связанные с социальной ролью в обществе (занятые высокие должности), до признания женщины более ценным звеном в процессе воспроизведения, выращивания и воспитания потомства, а это требует большей пластичности организма и улучшенной выживаемости [4–7].

К сожалению, имеющиеся публикации, посвященные данной тематике, все же не дают внятного ответа на вопрос, почему женщины живут дольше мужчин. Основа меньшей продолжительности жизни мужчин пока остается окончательно не выясненной ни с точки зрения ее эволюционного происхождения, ни с точки зрения соматических причин.

Конечно, уже сегодня понятно, что утверждение о вреде курения и большего потребления спиртного мужчинами по сравнению с женщинами не очень приближает нас к разгадке поставлен-

ного вопроса. Полагаем, что никто из нас не наблюдал самцов обезьян с сигаретой в зубах и бутылкой пива в лапе, а между тем продолжительность жизни самцов обезьян также ниже, чем у самок. В частности, американские исследователи свели воедино результаты длительных наблюдений за представителями 7 видов приматов, живущих в дикой природе: капуцинов из Коста-Рики, мирики (род паукообразных обезьян) из Бразилии, бабуинов и голубых мартышек из Кении, шимпанзе из Танзании, горилл из Руанды и лемуров сифака с Мадагаскара. Авторы пришли к однозначному выводу, что у всех исследованных видов самки живут дольше. Например, у изученной популяции шимпанзе самая старая самка дожила до 53 лет (вполне прилично даже по человеческим меркам), а самый старый самец – всего лишь до 43 лет. У горилл старейшей самке исполнилось 43 года, самцу – 38 лет [8].

Стоит также заметить, что у американских женщин смертность от рака легких увеличилась с 1950 по 1995 г. на 500%, что авторы публикации напрямую связывают с курением [9].

Нельзя обойти стороной и тот факт, что в странах с традиционно мусульманской религией,

где подавляющая часть населения не употребляет алкоголь совсем, эта гендерная разница в средней продолжительности жизни между мужчинами и женщинами никак не выбивается из общего строя.

Так как предлагаемая гипотеза об одной из причин того, почему женщины живут дольше мужчин, связана с ролью половых гормонов и, в первую очередь, тестостерона, здесь следует привести несколько на сегодня устоявшихся фактов.

Тестостерон является основным андрогеном у мужчин. Порядка 95% этого гормона секретируется клетками Лейдига в тестикулах и только 5% – надпочечниками. Секреция тестостерона клетками Лейдига регулируется лютеинизирующим гормоном, который синтезируется и вырабатывается гипофизом. Приблизительно 98% циркулирующего тестостерона связано с белками плазмы, а оставшиеся 2% циркулируют свободно [10].

Тестостерон является важным анаболическим гормоном, значительно влияющим на распределение энергии. Он стимулирует анаболизм, выражющийся в наращивании мускулов, и увеличивает метаболизм – скорость, с которой мускулы потребляют калории. Кроме того, тестостерон стимулирует сжигание жировой ткани, рост бороды и понижение тона голоса у мужчин. В диких популяциях птиц, рептилий и млекопитающих тестостерон ухудшает работу иммунитета и увеличивает тяжесть инфекций и количество смертей. В популяции человека с повышенным уровнем тестостерона наблюдается и повышенное количество случаев рака простаты [11].

Тестостерон вырабатывается как в мужском, так и в женском организме. Мужчины вырабатывают этого гормона в 10–18 раз больше, чем женщины [12–13]. Общепринято считать, что, начиная в среднем с 35 лет, и у мужчин, и у женщин количество тестостерона уменьшается на 1–1,5% в год. Но мужчины производят достаточное его количество до глубокой старости (80–90 лет), а у женщин после наступления менопаузы его количество падает сразу еще на 25–50% [14–19]. Однако в недавнем исследовании китайских ученых, проведенном на 1093 здоровых мужчинах из Шанхая в возрасте от 20 до 87 лет, были получены результаты, которые, судя по всему, удивили и самих исследователей. Среднее значение общего тестостерона по всем возрастным группам составило $15,36 \pm 4,86$ нмоль/л. Уровень общего тестостерона продемонстрировал тенденцию к снижению в возрасте от 20 ($17,31 \pm 4,95$ нмоль/л) до 35 ($14,40 \pm 4,33$ нмоль/л) лет. Хочется подчеркнуть, что именно тенденцию, т.к. видно, что эти различия не достоверны. Затем последовал отрезок (35–50 лет) с очень незначительным изменением концентрации тестостерона с минимумом в 50 лет ($14,19 \pm 3,93$ нмоль/л), а далее наблюдалась тенденция к увеличению, причем концентрация те-

стостерона достигла наивысшего уровня в возрасте 70–74 года ($16,36 \pm 6,23$ нмоль/л). Но даже в самой старшей группе 75–87-летних мужчин количество общего тестостерона достоверно не отличалось от его количества в группе 20–24-летних ($17,31 \pm 4,95$ нмоль/л и $15,96 \pm 5,56$ нмоль/л соответственно) [10]. Это исследование опровергает устоявшееся мнение о том, что после 35 лет количество тестостерона постоянно падает на 1–1,5% в год [10]. Авторы показали, что в разных возрастных категориях от 20 до 87 лет скорость падения концентрации тестостерона различна и в конечном итоге она ниже, чем 1–1,5% в год.

Понимая, что стали жертвой устоявшихся стандартов, мы провели дополнительное исследование научной литературы в этом направлении и обнаружили достаточное количество статей, позволяющих утверждать, что уровень общего тестостерона в сыворотке крови у мужчин в пожилом возрасте достоверно не отличается от такового для молодых мужчин [20–24].

Несколько слов еще о двух исследованиях, которые нам показались наиболее убедительными, так как в них принимало участие большое количество людей. Фрост с коллегами исследовали 783 мужчин в возрасте 20–29 лет и 600 мужчин в возрасте 60–74 лет, отобранных случайным образом, и обнаружили, что содержание общего тестостерона у здоровых молодых мужчин ($11,7 \pm 37,7$ нмоль/л) сопоставимо с таковым у здоровых пожилых индивидов ($11,2 \pm 37,8$ нмоль/л) [25].

Келсей и соавт. проанализировали набор данных, полученный в 13 исследованиях ($n=10097$; возрастной диапазон от 3 лет до 101 года), и не нашли никаких доказательств в поддержку прогрессирующего снижения уровня тестостерона у мужчин среднего и старшего возраста [26].

Только около 5% мужчин в возрасте от 70 до 79 лет имеют возрастной андрогенный дефицит, выражющийся в низком уровне тестостерона [15].

Здесь, вероятно, уместно будет привести два наиболее интересных на сегодня примера, подтверждающих, что ослабление влияния половых гормонов на организм мужчин увеличивает продолжительность их жизни. Мы не уверены, что сегодня найдется много желающих описанным ниже способом увеличить продолжительность жизни, но по данным многолетнего наблюдения результаты таковы. В одной из работ исследовали мужчин с психическими расстройствами, стерелизованных в США в начале-середине 20-го века. Анализ данных о смертности 297 кастрированных мужчин и 735 сопоставимых по возрасту людей без кастрации выявил значительное увеличение продолжительности жизни в группе кастраторов ($70,7$ против $64,7$ лет, $p < 0,001$) [27].

Еще более показательными являются результаты, описанные в публикации 2012 г. [28] по ис-

следованию евнухов в Императорском дворе династии Чосон в Корее. В то время евнухи имели высокий социальный статус, и существовали генеалогические записи, которые включали их даты рождения и смерти. Из таких записей периода 1556–1861 гг. был выявлен 81 евнук со средней продолжительностью жизни $70,0 \pm 1,76$ лет. Это, по сравнению со средней продолжительностью жизни обычных мужчин сопоставимого социального статуса в диапазоне 50,9–55,6 лет, очень много, то есть евнухи жили на 14,4–19,1 года дольше, чем мужчины, не подвергнутые кастрации в молодом возрасте. Более того, трое из 81 евнуха стали долгожителями, дожившими до 100, 101 и 109 лет, что в те времена было очень большой редкостью [28].

В процессе онтогенетического развития у всех млекопитающих, за исключением зимнеспящих, происходит необратимая возрастная атрофия тимуса. Существует мнение, что инволюция тимуса как важный фактор, управляющий старением, влияет на продолжительность жизни [29–32]. Следовательно, можно предположить, что замедление инволюции тимуса способствует увеличению продолжительности жизни.

Нам удалось достоверно увеличить продолжительность жизни у крыс с помощью трансплантации тимуса от молодых животных в иммунопривилегированную зону (передняя камера глаза) старых животных. Кривые кумулятивной выживаемости Каплана–Майера убедительно показывают, что крысам, родившимся весной, и животным осенне–зимнего помета удалось увеличить продолжительность жизни за счет трансплантации клеток тимуса от молодых животных 17–18-месячным особям. Мы связываем эти результаты с тем, что после пересадки тимуса от молодых животных в иммунопривилегированные зоны организма взрослым крысам у последних, вероятно, увеличивается количество тимоцитов, которое в условиях естественного старения необратимо уменьшается с возрастом. Иначе говоря, животные становятся «моложе» своих сверстников из интактной группы по иммунологическому статусу. Естественно было предположить, что такие животные будут жить дольше, что и удалось показать в данной серии экспериментов. У животных, родившихся весной и дополнительно получивших в 17–18-месячном возрасте молодые иммунокомпетентные клетки тимуса, средняя продолжительность жизни была больше по сравнению с интактными животными на 23,4%, минимальная – на 24,6%, а максимальная – на 28,9%. У крыс осенне–зимнего помета средняя продолжительность жизни была больше по сравнению с животными без трансплантации на 18,4%, минимальная – на 35%, а максимальная осталась неизменной [33].

Мы полагаем, что это произошло в результате посттранспланционного замедления скорости возрастной атрофии тимуса. Совместное функци-

онирование собственного тимуса и пересаженного тимуса от молодого животного с высоким пролиферативным потенциалом позволило частично ослабить отрицательное воздействие тестостерона на возрастную атрофию тимуса, точнее сказать, позволило снизить скорость этой атрофии. Таким образом, мы экспериментально подтвердили гипотезу о том, что замедление атрофии тимуса способствует увеличению продолжительности жизни животных.

Интересно отметить, что, если мы трансплантировали тимус в переднюю камеру глаза молодым 3,5-месячным животным, то не наблюдали достоверного увеличения минимальной, средней и максимальной продолжительности жизни, наблюдалась только тенденция к этому увеличению, различия были не достоверны [33]. Связано это с тем, что в этом возрасте количество тимоцитов у животных находится еще на довольно высоком уровне и функционально организму не требуется увеличить Т-клеточное звено иммунологической защиты.

Известно, что начало необратимой возрастной атрофии тимуса у человека приходится на период полового созревания. Вместе с тем, пока точно не известны механизмы, побуждающие организм к атрофии вилочковой железы. Мы полагаем, что одной из причин начала столь ранней атрофии тимуса является угнетающее действие тестостерона на его развитие. На сегодня убедительно показано, что этот гормон отрицательно влияет на функционирование тимуса. Существует довольно много работ, подтверждающих данный факт. В частности, отмечается, что тестостерон ингибирует развитие Т-лимфоцитов, играя заметную роль в возрастной атрофии тимуса, и вызывает апоптоз тимоцитов CD4+CD8+ в моделях *in vitro* и *in vivo* [34–37].

На животных нам удалось показать, сколь стремительна и значима необратимая возрастная атрофия тимуса уже на довольно ранних этапах жизни крыс Wistar. Так, количество тимоцитов у 8-месячных животных по сравнению с 2,5-месячными уменьшилось в 19 раз, а по сравнению с 19,5-месячными – в 64,6 раза [38, 39]. Эти эксперименты мы проводили на самцах. Опираясь на описанный выше материал, можно сделать предположение, что, благодаря меньшей концентрации тестостерона у самок, количество тимоцитов – а соответственно и иммунный статус – на тех же сроках у самок крыс будет выше.

Еще одним подтверждением того, что тестостерон, стимулируя атрофию тимуса [35, 37], снижает продолжительность жизни, служат данные по людям, занимающимся туризмом. Профессиональные бодибилдеры используют высокие дозы тестостерона и другие препараты, улучшающие спортивные результаты. Приведем результаты двух исследований. В первом исследовании

собраны данные по 597 спортсменам, которые соревновались в период с 1948 по 2014 гг. Смертность среди бодибилдеров в этой выборке была на 34% выше, чем среди мужского населения США того же возраста. Средний возраст спортсменов здесь составил только 47,7 года (диапазон 26,6–75,4 лет). Смертность увеличивалась в возрасте с 30 до 49 лет. Максимальная смертность среди спортсменов была констатирована в возрастной группе 45–49 лет. Значительных различий в показателях смертности у бодибилдеров старше 50 лет не наблюдалось [40].

Во втором исследовании собраны данные о причинах и возрасте смерти известных культуристов (49 человек), которые употребляли андрогены за период с 1991 по 2015 гг. Средний возраст умерших атлетов в изучаемой выборке еще меньше – 38,8 лет, наиболее характерный возраст – $36,7 \pm 10,6$ года. Вероятность того, что средний возраст смертности атлетов лежит в пределах от 37,6 до 43,6 лет, равна 95%. В этой группе также не наблюдалось значительных различий в показателях смертности у возрастных участников исследования старше 56 лет по отношению к мужчинам соответствующего возраста, не занимающимся культивизмом [41]. Это, вероятнее всего, связано с тем, что по окончанию спортивной карьеры они перестают употреблять андрогены.

Таким образом, разница в средней продолжительности жизни бодибилдеров в выборках с 1948 по 2014 гг. и с 1991 по 2015 гг. составляет 8,9 года. Мы полагаем, это связано с тем, что требования к объему мышечной массы и пропорциям культуристов с каждым годом ужесточаются и те дозы тестостерона, которые были обычны в середине и последней четверти прошлого века, не достаточны для достижения высоких результатов в наше время. Эти обстоятельства вынуждают спортсменов увеличивать количество принимаемых андрогенов, существенно снижая при этом их продолжительность жизни за счет негативного влияния последних на нормальное функционирование тимуса. При помощи маркетинговых технологий в сознание молодого поколения внедряется стереотип эталонного тела по образу фитнес-модели высокого класса. Недостаточная информированность приводит их в спортзалы к запредельным

физическим нагрузкам, ослабляющим сердечно-сосудистую систему, гормональной стимуляции роста мышечной массы и снижению продолжительности жизни.

Заключение

Почему женщины живут дольше мужчин?

Угнетающее влияние тестостерона на иммунную систему женщин значительно слабее, чем на иммунную систему мужчин (концентрация гормона в крови у женщин в несколько раз ниже, чем у мужчин, а после наступления менопаузы эти значения падают еще на 25–50%);

У мужчин даже после 75–80 лет количество тестостерона в крови остается высоким. В большей степени ослабевающая с возрастом иммунная система мужчин, за счет угнетающего влияния тестостерона, приводит к увеличению заболеваемости инфекционными, онкологическими и другими иммунозависимыми патологиями, что и снижает минимальную, среднюю и максимальную продолжительность их жизни по сравнению с женщинами.

Здесь следует отметить, что мы понимаем: описанный механизм, вероятно, не является единственным. Уже хотя бы потому, что тестостерон вырабатывается и в коре надпочечников, предположительно ускоряя необратимую возрастную инволюцию тимуса. Но вряд ли 5% его количества, вырабатываемые надпочечниками, могут стать определяющими при прекращении поступления гормона от клеток Лейдига, вырабатывающих 95% тестостерона [10]. Мы далеки от мысли, что однозначно ответили на вопрос о том, почему женщины живут дольше мужчин, но надеемся, что представленная работа послужит поводом для развернутой дискуссии по данной проблеме. Особенno хотелось бы услышать точку зрения эндокринологов о гормональной поддержке женщин в постменструальный период. Кажется, что здесь среди специалистов нет единого мнения.

Работа проведена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00381-21-00. Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yusipov I., Basalini M., Kalyakulina A. et al. Age-related DNA methylation changes are sex-specific: a comprehensive assessment // Aging. 2020. Vol. 12. N 23. P. 24057–24080.
2. Seifarth J.E., McGowan C.L., Milne K.J. Sex and life expectancy // Gender Med. 2012. Vol. 9. N 6. P. 390–401.
3. Eskes T., Haanen C. Why do women live longer than men? // Eur. J. Obstet. Gyn. R. B. 2007. Vol. 133. N 2. P. 126–133.
4. Regitz-Zagrosek V. Sex and gender differences in health // EMBO Rep. 2012. Vol. 13. P. 596–603.
5. Passarino G., Calignano C., Vallone A., Francesci C., Jeune B., Robine J.M., Yashin A.I., Cavalli Sforza L.L., Benedictis G.De. Male/female ratio in centenarians: a possible role played by population genetic structure // Exp. Gerontol. 2002. Vol. 37. N 10–11. P. 1283–1289.
6. Ostan P., Monti D., Gueresi P., Bussolotto M., Franceschi S., Baggio G. Gender, aging and longevity in

- humans: an update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine // Clin. Sci. 2016. Vol. 130. N 19. P. 1711–1725.
7. Franceschi C., Motta L., Valensin S., Rapisarda R., Franzone A., Berardelli M., Motta M., Monti D., Bonafè M., Ferrucci L. Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? // Aging. 2000. Vol. 12. N 2. P. 77–84.
 8. Bronikowski A.M., Altmann J., Brockman D., Crds M., Fedigan L.M., Pusey A., Stoinski T., Morris W.F., Strier K.B., Susan C. Reveal similar mortality patterns across primates // Science. 2011. Vol. 331. N 6022. P. 1325–1328.
 9. Baggio G., Corsini A., Floreani A., Giannini S., Zagone V. Gender medicine: a task for the third millennium // Clin. Chem. Lab. Med. 2013. Vol. 51. N 4. P. 713–727.
 10. Liu Z., Liu J., Shi X., Wang L., Yang Y., Tao M. Dynamic alteration of serum testosterone with aging: a cross-sectional study from Shanghai, China // Reprod. Biol. Endocrin. 2015. Vol. 13. N 111. P. 756–759.
 11. Calistro Alvarado L. Population differences in the testosterone levels of young men are associated with prostate cancer disparities in older men. // Am. J. Hum. Biol. 2010. Vol. 22. N 4. P. 449–455.
 12. Kurzweil R., Grossman T. Transcend: Nine steps to living well forever. Rodale Books, 2010. 480 pp.
 13. Travison T.G., Vesper H.W., Orwoll E.W., Wu F., Kaufman J.M., Wang Y., Lapaauw B., Fiers T., Matsumoto A.M., Bhasin S. Harmonized reference ranges for circulating testosterone levels in men of four cohort studies in the United States and Europe // J. Clin. Endocr. Metab. 2017. Vol. 102. N 4. P. 1161–1173.
 14. Древаль А.В. Менопауза // Русс. мед. журн. 2018. № 1. С. 3–7.
 15. Gems D. Evolution of sexually dimorphic longevity in humans // Aging. 2014. Vol. 6. N 2. P. 84–91.
 16. Samaras N., Papadopoulou M.A., Samaras D., Ongaro F. Off-label use of hormones as an antiaging strategy: a review // Clin. Interv. Aging. 2014. Vol. 23. N 9. P. 1175–1186.
 17. Huhtaniemi I. Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment // Asian J. Androl. 2014. Vol. 16. N 2. P. 192–202.
 18. Shifren J.L. Testosterone for midlife women: the hormone of desire? // Menopause. 2015. Vol. 22. N 10. P. 1147–1149.
 19. Dimopoulos C., Ceausu L., Depypere H., Lambrinoudaki I., Mueck A., Pérez-López F.R., Rees M., Schouw Y.T., Senturk L.M., Simonsen T.I., Stevenson J.C., Stute P., Gouli D.G. EMAS position statement: Testosterone replacement therapy in the aging male // Maturitas. 2016. Vol. 84. N 2. P. 94–99.
 20. Rhoden E.L., Teloken C., Sogari P.R., Souto C.A. The relationship of serum testosterone to erectile function in normal aging men // J. Urology. 2002. Vol. 167. N 4. P. 1745–1448.
 21. Boyce M.J., Baisley K.J., Clark E.V., Warrington S.J. Are published normal ranges of serum testosterone too high? Results of a cross-sectional survey of serum testosterone and luteinizing hormone in healthy men // Brit. J. Urol. 2004. Vol. 94. N 6. P. 881–885.
 22. Orwoll E.C., Lambert L.C., Marshall L.M., Phipps K., Blank J., Barrett-Connor E. Testosterone and estradiol among older men // J. Clin. Endocr. Metab. 2006. Vol. 91. N 4. P. 1336–1344.
 23. Yeap B.B., Almeida O.P., Hyde Z.E., Norman P.E., Chubb S.A., Jamrozik K. In men older than 70 years, total testosterone remains stable while free testosterone declines with age. The health in men study // Eur. J. Endocrinol. 2007. Vol. 156. N 5. P. 585–594.
 24. Halmenschlager G.F., Rhoden E.L., Riedner C.E. The influence of age on bioavailable and free testosterone is independent of body mass index and glucose levels // World J. Urol. 2011. Vol. 29. N 4. P. 541–546.
 25. Frost M., Wraae K., Nielsen T.L., Hougaard D.M., Brixen K., Hagen C. Similar reference intervals for total testosterone in healthy young and elderly men: results from the odense androgen study // Clin. Endocrinol. 2013. Vol. 78. N 5. P. 743–751.
 26. Kelsey T.W., Li L.Q., Mitchell R.T., Whelan A., Anderson R.A., Wallace W.H. A validated age-related normative model for male total testosterone shows increasing variance but no decline after age 40 years // PLoS. One. 2014. Vol. 9. N 10: e109346.
 27. Hamilton J.B., Mestler G.E. Mortality and survival: comparison of eunuchs with intact men in a mentally retarded population // J. Gerontol. 1969. Vol. 24. N 4. P. 395–411.
 28. Min K.J., Lee C.K., Park H.N. The lifespan of Korean eunuchs // Curr. Biol. 2012. Vol. 22. N 18. P. 792–793.
 29. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2008. Т. 1. 481 с.
 30. Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммunoэндокринологии. М.: Медицина, 2008. 512 с.
 31. Csaba G. The immunoendocrine thymus as a pacemaker of lifespan // Acta Microbiol. Imm. H. 2016. Vol. 63. N 2. P. 139–158.
 32. Csaba G. The role of the pineal-thymus system in the regulation of autoimmunity, aging and lifespan // Orvosi Hetilap. 2016. Vol. 157. N 27. P. 1065–1070.
 33. Kulikov A.V., Arkhipova L.V., Kulikova P.A., Glazkov A.A., Mndlyan E.Y., Gavrilyuk V.B., Kulikov D.A. Effects of birth season and thymus transplantation on experimental animal longevity // Biol. Bull. 2019. Vol. 46. N 1. P. 33–37.
 34. Демьяненко С.В., Чистяков В.А., Водопьянов А.С., Брень А.Б. Возрастные изменения тимусзависимого звена иммунной системы // Ж. фунд. мед. биол. 2012. № 1. С. 17–27.
 35. Guevara Patino J.A., Marino M.W., Ivanov V.N., Nikolic-Zugich J. Sex steroids induce apoptosis of CD8+CD4+ doublepositive thymocytes via TNF-alpha // Eur. J. Immunol. 2000. Vol. 30. N 9. P. 2586–2592.
 36. Olsen N.J., Olson G., Viselli S.M., Gu X., Kovacs W.J. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development // Endocrinology. 2001. Vol. 142. N 3. P. 1278–1283.
 37. Hince M., Sakkal S., Vlahos K., Dudakov J., Boyd R., Chidgey A. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymus involution // Cell. Immunol. 2008. Vol. 252. N 1–2. P. 122–138.
 38. Kulikov A.V., Arkhipova L.V., Smirnova G.N., Korystov Yu.N., Shaposhnikova V.V., Tret'yak T.M., Kulikov D.A., Chailakhyan L.M. May the rate of thymus age-related involution be reduced by grafting immunocompetent or neural tissues? // Dokl. Biol. Sci. 2007. Vol. 414. N 1. P. 185–186.

39. Куликов А.В., Архипова Л.В., Смирнова Г.Н., Новоселова Е.Г., Шпуррова Н.А., Шишикова Н.В., Сухих Г.Т. Замедление темпа необратимой возрастной атрофии вилочковой железы с помощью атопической аутотрансплантации длительно криоконсервированной ее ткани // Усп. геронтол. 2010. Т. 23. № 1. С. 76–80.

40. Gwartney D., Allison A., Pastuszak A.W., Canales S., Stoll W.T., Lindgren M.C., Eisenberg M.L., Lipshultz L.I. MP47-17 rates of mortality are higher among professional male bodybuilders // J. Urol. 2016. Vol. 199. N 4S: e633.

41. Сологуб И.С., Муратов И.В., Чилигин Д.В., Ханадамаев А.О., Ткаченко П.А., Романов Р.В. Негативное влияние допинга на организм занимающихся бодибилдингом // Междунар. науч.-иссл. журн. 2017. Т. 66. № 12. С. 161–166.

Поступила в редакцию 24.03.2021 г.

После доработки 02.06.2021 г.

Принята в печать 02.07.2021 г.

OPINION ARTICLE

Testosterone and life span or why women live longer than men. A hypothesis

A.V. Kulikov* , L.V. Arkhipova 

*Laboratory of Cellular and Tissue Functions Bioobjects Compensation Mechanisms,
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya st. 3, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia*

*e-mail: 29.04.55@mail.ru

Women around the world live longer than men. The question of why this is happening is very interesting, but still unresolved in gerontology. There are a number of proposals to explain the mechanisms underlying this phenomenon, but there are no clearly confirmed or refuted ones among them. This is probably due to the fact that it is extremely difficult to organize testing of such hypotheses for *Homo sapiens*, and the available data on animals are often contradictory and their results cannot be fully transferred to humans. In the article, we tried to identify one of the possible mechanisms leading to sex differences in life expectancy in the human population. The depressing effect of testosterone on the immune system of women is much weaker than on the immune system of men. The concentration of testosterone in the blood of men is 10–18 times higher than that of women, and after the onset of menopause, the already low concentration of testosterone in women drops by another 25–50%. The inhibitory effect of testosterone on the immune system of women is much weaker than on the immune system of men with respect to both concentration and duration of the effect. The immune system of men weakens with age to a greater extent, which leads to an increased incidence of infectious, oncological, and other immune-dependent pathologies, which just reduces the minimal, middle, and maximum life span of men compared with women.

Keywords: *life span, thymus, testosterone, immune system, castration, transplantation*

Funding: This study was performed under the state assignment of Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, No. 075-00381-21-00.

Сведения об авторах

Куликов Александр Владимирович – докт. биол. наук, зав. лабораторией клеточно-тканевых механизмов компенсации функций биообъектов Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-4967-739-194; e-mail: 29.04.55@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1434-0615>

Архипова Любовь Валентиновна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории клеточно-тканевых механизмов компенсации функций биообъектов Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-4967-739-194; e-mail: arkipova.53@list.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1957-339X>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.352.54+522+612.176.2

Фенотипические проявления миссенс-мутации Val93Ile и ее влияние на функционирование канала Kir2.1

**Х. Чжан¹, Г.С. Глухов², К.Б. Пустовит³, Ю.Г. Качер², В.С. Русинова⁴,
И.И. Киселева⁵, В.Н. Комолятова⁵, Л.М. Макаров⁵,
Е.В. Заклязьминская⁴, О.С. Соколова^{1,2,*}**

¹*Shenzhen MSU-BIT University, China, 517182, Shenzhen, 1 International University Park Road;*

²*кафедра биоинженерии и ³кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*

⁴*Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского,
Россия, 119991, г. Москва, ГСП-1, пер. Абрикосовский, д. 2;*

⁵*Центр синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков, ФМБА России,
Россия, г. Москва, 115481, ул. Москворечье, д. 20*

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

Впервые у пациента с асимптомным удлинением интервала QT на электрокардиограмме была выявлена миссенс-мутация c.277G>A (p.Val93Ile) в гене *KCNJ2*, ранее описанная в литературе только как причина семейной формы фибрилляции предсердий. Соответствующая аминокислотная замена была введена в плазмиду, кодирующую канал Kir2.1, и мутантный ген был экспрессирован в клетках яичника китайского хомячка (CHO-K1), чтобы оценить влияние мутации на параметры тока I_{K1} . С помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации *whole-cell* в режиме фиксации потенциала провели изучение интегрального тока I_{K1} . В результате исследования было показано, что мутация c.277G>A (p.Val93Ile) реализуется по типу усиления функции канала Kir 2.1. Наличие стабильного активирующего влияния на функцию белка свидетельствует в пользу клинической значимости выявленного варианта.

Ключевые слова: потенциал-зависимые калиевые ионные каналы, *Kir2.1*, *KCNJ2*, синдром удлиненного интервала QT, первичные каналопатии, электрофизиология

Ионные каналы – достаточно обширный и функционально значимый класс мембранных белков, который играет важнейшую роль в регуляции физиологического состояния клетки [1]. Нарушение функционирования ионных каналов приводит к изменению электрофизиологических свойств клеток, что на уровне организма проявляется нарушениями ритма и проводимости. Наследственные каналопатии развиваются вследствие генетически обусловленных нарушений в работе ионных каналов [2].

Калиевый канал *Kir2.1*, кодируемый геном *KCNJ2* на 17-й хромосоме (17q23.1 ~ 24.2), активно экспрессируется в кардиомиоцитах, а также нервной и мышечной ткани, где отвечает за фоновый калиевый ток входящего выпрямления I_{K1} , поддерживающий потенциал покоя, а, следовательно, и возбудимость клеток. Генетические изменения в гене *KCNJ2*, по-разному нарушающие функционирование этого канала, формируют аллельную серию заболеваний сердца с различными электрокардиографическими проявлениями, но объединенные высоким риском внезапной сер-

дечной смерти. Мутации в гене *KCNJ2* могут приводить к семейной форме мерцательной аритмии (MIM*613980) [3], синдрому короткого интервала QT, тип 3 (MIM*609622), изолированному синдрому удлиненного интервала QT, тип 7 (MIM*170390), а также к мультисистемному заболеванию – синдрому Андерсена-Тавила: гипокалиемическому периодическому параличу с удлинением интервала QT (MIM*170390) [4].

Данные о влиянии конкретной мутации на калиевую приводимость канала *Kir2.1* важны для оценки риска нарушений ритма сердца, дозирования физических нагрузок и решения вопроса об антиаритмической терапии. В настоящей работе мы провели функциональный анализ миссенс-мутации c.277G>A(p.Val93Ile) в гене *KCNJ2*, впервые выявленной у пациента с асимптомным удлинением интервала QT на электрокардиограмме (ЭКГ). Мы искусственно ввели эту замену в плазмиду, кодирующую канал *Kir2.1*, и экспрессировали мутантный ген в клетках яичника китайского хомячка (CHO-K1), чтобы оценить влияние мутации на параметры тока I_{K1} . Мы использовали

комплексный подход, включающий изучение интегрального тока I_{K1} с помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации *whole-cell* в режиме фиксации потенциала. В результате исследования было показано, что мутация c.277G>A(p.Val93Ile) реализуется по типу “*gain of function*” и значимо меняет функционирование канала Kir 2.1.

Материалы и методы

Клиническое и генетическое обследование. Клиническое и генетическое обследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинской декларации и с письменного информированного согласия совершеннолетних членов семьи. Клиническое обследование включало общий осмотр, сбор персонального и семейного анамнеза, общий и биохимический анализ крови, ЭКГ покоя, лежа, стоя и после физической нагрузки, ультразвуковое исследование сердца.

Генетическое исследование было выполнено на образцах ДНК, выделенной из лейкоцитов венозной крови, согласно стандартному протоколу. Поиск мутаций был выполнен методом секвенирования таргетной панели 11 генов, ответственных за наиболее часты наследственные аритмогенные синдромы (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *SCN5A*, *SCN1B-4B*, *SNTA1*), на платформе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) с использованием набора Ion AmpliSeq™ Exome Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Первичная обработка прочтений была выполнена при помощи программного обеспечения Ion Proton Software (Thermo Fisher Scientific, США), выравнивание на референсную последовательность ДНК версии hg19 осуществляли с помощью программы BWA 0.7.9. Оценку патогенности выявленных вариантов проводили с использованием критериев патогенности ACMG2015 [5]. Все выявленные варианты III–V классов патогенности были подтверждены независимым методом – прямым двунаправленным секвенированием по Сенгеру на приборе ABI 3730XL DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США).

Плазмида. В работе были использованы следующие плазмиды:

- pcDNA3.1-Kir 2.1: кДНК гена *KCNJ2* в классическом векторе pcDNA3.1 для конститтивной экспрессии в различных линиях клеток млекопитающих.

- pEGFP-N1: кодирует оптимизированный вариант зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) с более яркой флуоресценцией и усиленной экспрессией в клетках млекопитающих.

Введение точечной мутации в последовательность канала Kir2.1. Точечную мутацию в последовательность канала Kir2.1 вносили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использо-

ванием высокоточной полимеразы Q5. В качестве матрицы для внесения мутаций использовали плазмиду pcDNA3.1, содержащую последовательность канала Kir 2.1 дикого типа. Использовали следующие праймеры: прямой праймер 5'-CCTGGCTTCATCCTGTCATGG-3' и обратный праймер 5'-CAGAAGATAACCAGCATCCACC-3'. Прямой праймер содержал замену основания G на основание A, что соответствует одноклеотидной замене в положении 277 в гене канала. Амплификацию производили по следующему протоколу: денатурация осуществлялась на 98°C, отжиг праймеров при температуре 60 °C, элонгация при 72 °C в течение 4 мин. После проведения ПЦР продукт анализировали в 0,7%-ном агарозном геле, затем выделяли его с помощью набора QIAquick и последовательно инкубировали с нуклеазой DpnI, T4-полинуклеотидкиназой и T4-ДНК-лигазой. На последнем шаге производили трансформацию химически компетентных бактериальных клеток методом теплового шока. Посев клеток производили на агаризованную среду LB с селективным антибиотиком и инкубировали их в течение ночи при 37°C. Плазмиды из полученных клонов на предмет наличия необходимой мутации и отсутствия дополнительных одноклеотидных замен проверяли секвенированием по Сенгеру (Евроген, Россия).

Эукариотические клетки. Клетки СНО-К1 выращивали на круглых покровных стеклах в чашках Петри диаметром 35 мм в свежей среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% телячьей сыворотки (Gibco, Великобритания), в присутствии 100 мкг/мл пенициллин-стрептомицина (Gibco, Великобритания) при температуре 37°C и 5% CO₂ в воздушной смеси.

Трансфекцию клеток производили двумя вариантами плазмида pcDNA3.1, кодирующей мутантный и нативный варианты канала. Для визуализации клеток к плазмиде с геном канала добавляли плазмиду pEGFP-N1, кодирующую GFP в отношении 5:1 и производили трансфекцию двумя плазмидами. Клетки трансфицировали с помощью реагента Lipofectamine LTX and Plus (Invitrogen, США). Смесь перед добавлением в среду инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, после внесения клетки помещали в инкубатор на 48 ч до проведения пэтч-кламп, через сутки среду заменяли на свежую.

Электрофизиология. Для исследования культуры клеток СНО-К1 на небольшом покровном стекле помещалась в экспериментальную камеру с постоянным протоком раствора следующего состава (ммоль/л): NaCl – 150, KCl – 5,4, CaCl₂ – 1,8, MgCl₂ – 1,2, глюкоза – 10, HEPES – 10, pH доведен до 7,6 с помощью NaOH, расположенную на столике инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Регистрация токов проводилась при комнатной тем-

пературе ($23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) с помощью усилителя Axopatch 200B (Molecular Devices, США). Для регистрации выбирались только клетки, испускавшие флуоресцентный сигнал при облучении их возбуждающим светом с длиной волны 480 нм. Пэтч-пипетки сопротивлением 1,5–2,5 МОм изготавливались из боросиликатного стекла (Sutter, США) и заполнялись раствором следующего состава (ммоль/л): KCl – 140, MgCl₂ – 1, EGTA – 5, MgATP – 4, Na₂GTP – 0,3, HEPES – 10, pH доведен до 7,2 с помощью KOH. Перед началом регистрации тока компенсировались емкость пипетки, емкость исследуемой клетки и сопротивление доступа. При обработке данных амплитуды токов нормировались на емкость клетки и выражались в пА/пФ.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 7. Достоверность различий в параметрах I_{K1} между группами клеток при различных значениях мембранных потенциала определяли с помощью двухфакторного ANOVA с поправкой Тьюки.

Результаты и обсуждение

Клиническое наблюдение. Родители пациентки Д. (пробанд), результативной спортсменки (баскетбол), впервые обратились за детальным кардиологическим и генетическим обследованием,

когда в 13 лет у дочери было выявлено удлинение интервала QT на ЭКГ. Продолжительность интервала QTc в покое (до 454 мс) превышала нормальные значения (≤ 440 мс), но не достигала уровня диагностической значимости (более 480 мс у женщин) (рис. 1A). Удлинение интервала QTc при ортопробе было более значительным и достигало 568 мс (рис. 1Б). Жалоб на состояние здоровье не было, спортивные нагрузки выдерживала, обмороков и случаев внезапной смерти среди известных родственников не было. При детальном кардиологическом обследовании родственников первой степени родства умеренное асимптомное удлинение интервала QTc до 465 мс было выявлено только у отца. В семейном анамнезе указаний на наличие наследственных заболеваний сердца, случаев внезапной смерти, а также перенесенных кардиохирургических вмешательств не было выявлено. Младшему брату пациентки (жалоб нет, не обследован) также рекомендован ЭКГ-скрининг. До настоящего времени пациентка наблюдается в течение 2 лет без отрицательной динамики.

Генетическое исследование. В результате ДНК-диагностики у probanda была выявлена редкая замена c.277G>A (p.Val93Ile) в гене KCNJ2 в гетерозиготном состоянии (рис. 1В). В ДНК матери этой замены выявлено не было, отец от генетического

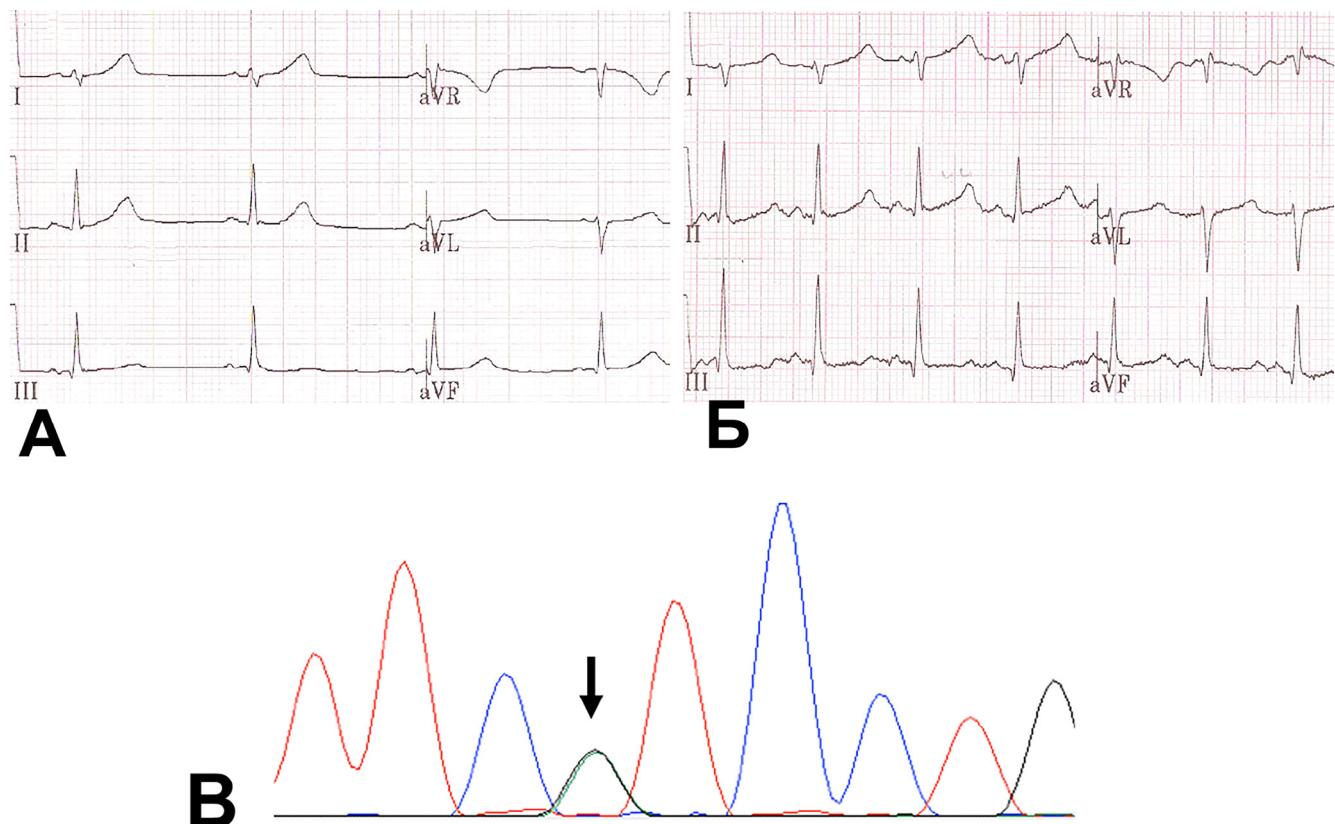
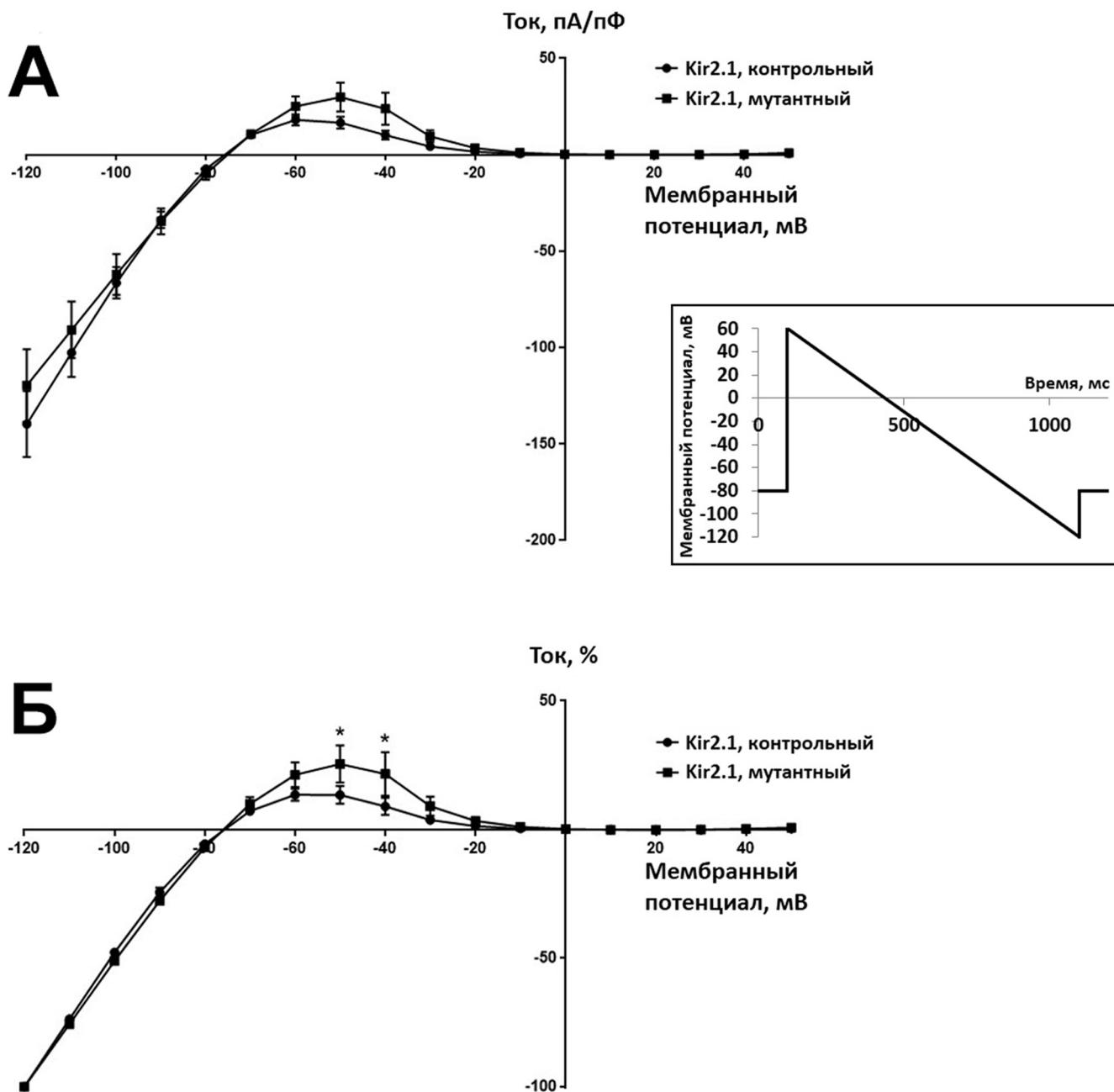


Рис. 1. А. Фрагмент ЭКГ покоя пациентки Д. (лежа). Выраженная синусовая брадиаритмия, средняя частота сердечных сокращений (ЧСС) – 59 уд./мин, средний QTc – 449 мс. Б. Фрагмент ЭКГ в ортопробе. Избыточный прирост ЧСС, ЧСС средняя – 74 уд./мин, QTc – 568 мс. Скорость регистрации ЭКГ 25 мм/с (1 мм = 0,04 с), вольтаж 1 см = 1 мВ (мВ). В. Фрагмент хроматограммы прямого секвенирования гена KCNJ2. Замена c.277G>A (p.Val93Ile) в гетерозиготном состоянии указана стрелкой.

обследования отказался. Ранее эта же замена была описана как причина другой каналопатии – семейной формы фибрилляции предсердий [6, 7]. Популяционная частота встречаемости этого варианта по данным gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) составляет 0,000155 аллелей (0,0155% аллелей), или 31:100 000 человек, что ниже, чем оценочная встречаемость наследственных аритмогенных синдромов (1:2000 населения, или 50:100000 населения).

Электрофизиология. Ток I_{K1} индуцировали с помощью изменения мембранных потенциала по линейному протоколу от +60 до -120 мВ: резкий сдвиг от поддерживаемого потенциала -80 мВ до +60 мВ с последующим линейным сдвигом до -120 мВ (рис. 2, вставка). В ходе сдвига потенциала регистрировали ток с характерной для I_{K1} вольтамперной зависимостью. При потенциалах негативнее калиевого равновесного в обеих группах клеток наблюдался



входящий ток с практически линейной зависимостью от потенциала. При потенциалах позитивнее калиевого равновесного регистрировался выходящий ток, уменьшающийся при приближении потенциала к 0 мВ и практически отсутствующий при положительных значениях потенциала (рис. 2А). Таким образом, трансфекция как контрольной, так и мутантной плазмидой приводит к экспрессии в клетках CHO-K1 полностью функциональных калиевых каналов Kir2.1, генерирующих ток I_{K1} .

В связи с существенным разбросом в амплитуде тока I_{K1} в исследуемых клетках нам не удалось обнаружить достоверных различий между контрольной и опытной группами клеток ($n=10$, $n=10$, $p>0,05$) по величине входящей или выходящей компоненты I_{K1} (рис. 2А). Поскольку в физиологических условиях мембранный потенциал всегда позитивнее калиевого равновесного потенциала, функциональное значение имеет лишь выходящая компонента I_{K1} . Поэтому нормирование амплитуды I_{K1} было проведено по величине незначимой входящей компоненты при -120 мВ [6]. Выходящая компонента нормированного тока в клетках, трансфицированных мутантной плазмидой, была существенно больше, чем в контрольной группе клеток ($n=10$, $n=10$, $p<0,05$), при -40 и -50 мВ (рис. 2Б).

Это различие позволяет заключить, что исследуемая мутация в гене канала Kir2.1 приводит к усилию выходящей компоненты тока I_{K1} , иными словами – к усилию физиологической функции канала (*gain of function*). С точки зрения

электрофизиологии сердца усиление тока I_{K1} приводит, с одной стороны, к стабилизации потенциала покоя и подавлению потенциальных эктопических очагов автоматии, а с другой – к ускорению заключительных стадий реполяризации и укорочению потенциалов действия, которое может рассматриваться как проаритмический эффект (по крайней мере – в наджелудочковых отделах сердца).

Ранее эта же замена в гене канала *KCNJ2* была ассоциирована только с фибрилляцией предсердий [7, 8]. При синдроме удлиненного интервала QT нарушена реполяризация в желудочках, поэтому нам было так интересно изучить электрофизиологические характеристики мутантного ионного канала Kir2.1. Полученные нами данные согласуются с описанными в соответствующих публикациях [7, 8]. Наличие стабильного активирующего влияния на функции белка свидетельствует в пользу клинической значимости выявленного варианта. В настоящее время отцу и дочери в программе динамического наблюдения проводятся ежегодные ЭКГ-обследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-15004). Клиническое и генетическое обследование пациента было выполнено в соответствии с принципами Хельсинской декларации и с письменного информированного согласия совершеннолетних членов семьи. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколова О.С., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. и др. Современные методы изучения структуры и функции ионных каналов. М.: Товарищество науч. изд. КМК, 2020. 316 с.
2. Imbrici P., Liantonio A., Camerino G.M., De Bellis M., Camerino C., Mele A., Giustino A., Pierro S., De Luca A., Tricarico D., Desaphy J.F., Conte D. Therapeutic approaches to genetic ion channelopathies and perspectives in drug discovery // Front. Pharmacol. 2016. Vol. 7. P. 121.
3. Munger T.M., Wu L.-Q., Shen W.K. Atrial fibrillation // J. Biomed. Res. 2014. Vol. 28. N 1. P. 1–17.
4. Plaster N.M., Tawil R., Tristani-Firouzi M., et al. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome // Cell. 2001. Vol. 105. N 4. P. 511–519.
5. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // Genet. Med. 2015. Vol. 17. N 5. P. 405–424.
6. Lopez-Izquierdo A., Ponce-Balbuena D., Ferrer T., Sachse F.B., Tristani-Firouzi M., Sanchez-Chapula J.A. Chloroquine blocks a mutant Kir2.1 channel responsible for short QT syndrome and normalizes repolarization properties *in silico* // Cell. Physiol. Biochem. 2009. Vol. 24. N 3–4. P. 153–160.
7. Xia M., Jin Q., Bendahhou S. et al. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. Vol. 332. N 4. P. 1012–1019.
8. Kharche S., Garratt C.J., Boyett M.R., Inada S., Holden A.V., Hancox J.C., Zhang H. Atrial proarrhythmia due to increased inward rectifier current ($I(K1)$) arising from *KCNJ2* mutation – a simulation study // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2008. Vol. 98. N 2–3. P. 186–197.

Поступила в редакцию 18.05.2021 г.

После доработки 07.06.2021 г.

Принята в печать 18.06.2021 г.

SHORT COMMUNICATION

Phenotypic manifestations of Val93Ile missense mutation and its influence on Kir2.1 channel functioning

**H. Zhang¹, G.S. Glukhov², K.B. Pustovit³, Yu.G. Kacher², V.S. Rusinova⁴, I.I. Kiseleva⁵,
V.N. Komolyatova⁵, L.M. Makarov⁵, E.V. Zaklyazminskaya⁴, O.S. Sokolova^{1,2,*}** 

¹*Shenzhen MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Shenzhen, 517182, China;*

²*Department of Bioengineering and ³Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

⁴*B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery, 2 Abrikosovsky ln., Moscow, 119991, Russia;*

⁵*Center for Syncopal Conditions and Cardiac Arrhythmias in Children and Adolescents, FMBA of Russia,
20 Moskvorechye st., Moscow, 115481, Russia*

^{*}e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

A patient with asymptomatic QT interval prolongation was found to have missense mutation c.277G>A (p.Val93Ile) in the KCNJ2 gene, previously described in the literature as the cause of a familial form of atrial fibrillation only. The corresponding amino acid substitution was introduced into the plasmid encoding the Kir2.1 channel and the mutant gene was expressed in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) to evaluate the effect of the mutation on IK1 current parameters. Using the whole-cell patch-clamp technique in the potential fixation mode, the integral current of IK1 was studied. As a result of the study, it was shown that the c.277G>A (p. Val93Ile) mutation is implemented according to the “gain of function” type and significantly changes the functioning of Kir 2.1 channel. The presence of a stable activating effect on protein function argues in favor of the clinical significance of the identified variant.

Keywords: *voltage-dependent potassium ion channels, Kir2.1, KCNJ2, prolonged QT interval syndrome, primary channelopathies, electrophysiology*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number № 20-54-15004.

Сведения об авторах

*Чжан Хань – аспирант биологического факультета МГУ-ППИ. Тел.: 8-495-939-57-38;
e-mail: zhang.han100@qq.com*

Глухов Григорий Сергеевич – канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: gluhovg@gmail.comkache

Пустовит Ксения Борисовна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: k_pustovit@mail.ru

Качер Юлия Генриховна – студент магистратуры кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: juliakacher007@gmail.com

Русинова Валерия Сергеевна – науч. сотр. Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В.Петровского, тел.: 8-499-248-15-55; e-mail: rusinovavaleria@yandex.ru

Киселева Ирина Ивановна – канд. мед. наук, врач–детский кардиолог Центра синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков. Тел.: 8-499-324-34-64; e-mail: info@kidsfmba.ru

Комолятова Вера Николаевна – докт. мед. наук, врач–детский кардиолог Центра синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков. Тел.: 8-499-324-34-64; e-mail: verakom@list.ru

Макаров Леонид Михайлович – докт. мед. наук, рук. Центра синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков. Тел.: 8-499-324-34-64; e-mail: info@kidsfmba.ru

Заклязминская Елена Валерьевна – докт. мед. наук, зав. лаб. медицинской генетики Российской научного центра хирургии им. акад. Б.В.Петровского, Тел.: 8-499-248-15-55; e-mail: zhelene@mail.ru

Соколова Ольга Сергеевна – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru; ORCID: http://orcid.org/0000-0003-4678-232X

ERRATUM

Исправление в статье “Способность мексидола усиливать антиэксудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у крыс и мышей”

Е.А. Иванова^{1,*} , А.И. Матюшкин¹ , А.Г. Васильчук¹ , Т.А. Воронина¹ 

Исправление в статье:

Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А. Способность мексидола усиливать антиэксудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у крыс и мышей // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2021. Т. 76. № 2. С. 61–66.

Страница – 65

Колонка – правая

Ссылка – 12

Напечатано

12. Воронина Т.А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия // Фарматека. 2009. Т. 180. № 6. С. 1–4.

Следует читать

12. Воронина Т.А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия // Фарматека. 2009. Т. 180. № 6. С. 28–31.

Страница – 66

Колонка – левая

Ссылка – 18

Напечатано

18. Иванова Е.А., Васильчук А.Г., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Усиление противовоспалительного и анальгетического эффекта диклофенака натрия при его применении в комбинации с мексидолом в эксперименте на грызунах // Эксперим. клин. фармакол. 2020. Т. 83. № 8. С. 38–42.

Следует читать

18. Иванова Е.А., Васильчук А.Г., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Усиление противовоспалительного и анальгетического эффекта диклофенака натрия при его применении в комбинации с мексидолом в эксперименте на грызунах // Эксперим. клин. фармакол. 2020. Т. 83. № 7. С. 22–26.

Исходную статью можно найти на сайте журнала – <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/992>

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;
*e-mail: iwanowaea@yandex.ru

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 завершенные 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 РИНЦ, ВИНИТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, английская – в Scopus, SCImago, EBSCO Discovery Service, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Central, AGRICOLA, EMBiology, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Dimensions, Google Scholar и др. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ русскоязычной версии составляет 0,924, показатель CiteScore 2020 (Scopus) англоязычной версии – 1,3.

После принятия статьи в печать редакция высылает авторам договоры с издателем журнала, которые необходимо заполнить и подписать всем соавторам. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Заполненные и подписанные договоры можно присыпать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присыпать 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). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, межстрочный интервал – полуторный, отступ – 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается [шаблон статьи](#)). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). Объемы, значительно отличающиеся от рекомендованных, необходимо согласовывать с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (полужирным шрифтом, кегль 14), 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, Сибирское отделение Российской академии наук, 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 Российской 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 указывается дата отправки рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за перепискну, 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

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке:

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-00000000000-0).

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 не должно быть избыточным (рекомендуется приводить не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. 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 реальное (не интерполированное!) 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 различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и пристатейного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном – напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). 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:

Litchfield K., Reading J.L., Puttick C., Thakkar K., Abbosh C., Bentham R., Watkins T.B., Rosenthal R., Biswas D., Rowan A., Lim E. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition // Cell. 2021. Vol. 184. N 3. P. 596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes // PloS One. 2020. Vol. 15. N 4: e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеенко А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённов А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости // Комп. исслед. моделир. 2020. Т. 12. № 6. С. 1383-1395.

Книга:

Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 pp.

Рязанова Г.И. Поведение насекомых. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2019. 232 с.

Статья в сборнике:

Mahajan M., Yadav R.K. Labeling and sorting of arabidopsis SAM cell populations to capture their transcriptome profile // Plant stem cells. Methods in molecular biology, vol. 2094 / Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana, 2020. P. 39–47.

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., Борзых 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: 11.03.2021).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.02.2021).

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.

Дополнительные правила 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 аbbревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нукleinовые кислоты, аминокислоты (например, аденоzинтрифосфорная кислота – АТФ, дезоксирибонукleinовая 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 кузнецов 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 требованиями, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7–10 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присыпает 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., внеся 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.

Полезные ссылки

Список сокращённых названий журналов можно найти [здесь](#)

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

О том, как правильно сокращать общепринятые термины, можно прочитать [здесь](#)