

# Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 77 • № 4 • 2022 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзоры

Назаров П.А., Кузнецова А.М., Каракозова М.В. Помпы множественной лекарственной устойчивости как краеугольный камень резистентности бактерий . . . 215

### Оригинальные исследования

Зворыкин Д.Д. Выбор партнера по размножению и размерная ассортативность спаривания у рыбы-ползуна *Anabas testudineus* (Actinopteri: Anabantidae) . . . . . 224

Швецова А.А., Моргунова Г.В., Новодережкина Е.А., Потехина В.М., Каменский А.А., Тарасова О.С. Механизмы холинергического сокращения гладкой мускулатуры кишечника беломорской трески *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae): вклад различных подтипов М-холинорецепторов и Rho-киназы . . . . 231

Герасимова Н.С., Ахтар М.С., Студитский В.М. Влияние одонитовых разрывов ДНК на транскрипцию нуклеосом . . . . . 241

Лебедева Е.И., Бабенко А.С., Щастный А.Т. Уровень экспрессии мРНК *CXCL12* как независимый маркер прогрессирования фиброза печени у крыс . . . 248

Летухова В.Ю., Зуев А.В., Потапенко И.Л. Влияние климатических факторов на продолжительность цветения видов в Карадагском природном заповеднике . . . . . 258

### Краткие сообщения

Дин Ф., Красильникова А.А., Леонтьева М.Р., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Анализ кефирных зерен из разных регионов планеты с применением высокопроизводительного секвенирования . . . . . 265

### Мнения

Хохлов А.Н. О холестеринной теории старения — 2022 . . . . . 273

Указатель статей, опубликованных в журнале «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» в 2022 г. . . . . 279

## CONTENTS

### Reviews

- Nazarov P.A., Kuznetsova A.M., Karakozova M.V. Multidrug resistance pumps as a keystone of bacterial resistance. . . . . 215

### Research articles

- Zworykin D.D. Mate choice and size-assortative mating in the climbing perch *Anabas testudineus* (Actinopteri: Anabantidae) . . . . . 224
- Shvetsova A.A., Morgunova G.V., Novoderezhkina E.A., Potekhina V.M., Kamensky A.A., Tarasova O.S. Mechanisms of the White Sea cod *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae) intestinal smooth muscle cholinergic contraction: the contribution of various subtypes of M-cholinergic receptors and Rho-kinase . . . . . 231
- Gerasimova N.S., Akhtar M.S., Studitsky V.M. Effect of single-strand DNA breaks on transcription of nucleosomes . . . . . 241
- Lebedeva E.I., Babenka A.S., Shchastny A.T. *CXCL12* mRNA expression as an independent marker of liver fibrogenesis in rats . . . . . 248
- Letukhova V.Ju., Zuev A.V., Potapenko I.L. Impact of climatic factors on the duration of species flowering in the Karadag Nature Reserve . . . . . 258

### Short communications

- Ding F., Krasilnikova A.A., Leontieva M.R., Stoyanova L.G., Netrusov A.I. Analysis of kefir grains from different regions of the planet using high-throughput sequencing. . . . . 265

### Opinion articles

- Khokhlov A.N. On the cholesterol theory of aging — 2022 . . . . . 273
- Index of papers published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2022 . . . 279

## ОБЗОР

УДК 579.22+615.33

# Помпы множественной лекарственной устойчивости как краеугольный камень резистентности бактерий

П.А. Назаров<sup>1,\*</sup> , А.М. Кузнецова<sup>2</sup> , М.В. Каракозова<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Отдел биоэнергетики, научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 43;

<sup>2</sup>Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205, г. Москва, Большой бульвар, д. 30, стр. 1

\*e-mail: nazarovpa@gmail.com

Устойчивость к антибиотикам представляет собой глобальную проблему современной медицины. Предвестником наступления постантибиотической эры является сложность и дороговизна разработки новых антибиотиков, а также их неэффективность из-за быстро развивающейся устойчивости бактерий. Краеугольным камнем бактериальной защиты от антибиотиков являются помпы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), которые участвуют в формировании устойчивости к ксенобиотикам, экспорте токсинов, поддержании клеточного гомеостаза, образовании биопленок и персистентных клеток. Помпы МЛУ — это основа неспецифической защиты бактерий, в то время как модификация мишени лекарственного средства, инактивация лекарственного средства, переключение мишени или секвестрация мишени — вторая, специфическая, линия их защиты. Таким образом, сформированная помпами МЛУ неспецифическая защита бактерий — барьер, препятствующий попаданию антибактериальных веществ внутрь клетки, что является основным фактором, определяющим устойчивость бактерий. Понимание механизмов работы помп МЛУ и взвешенная оценка их вклада в общую устойчивость, а также в чувствительность к антибиотикам позволят либо серьезно отсрочить наступление постантибиотической эры, либо предотвратить ее наступление в обозримом будущем.

**Ключевые слова:** множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), помпы, антибиотики, ксенобиотики, биопленки, персистеры, бактериофаги

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-215-223

## 1. Конец золотой эры антибиотиков

Проблема антибиотикорезистентности актуальна в наши дни как никогда. Антибиотики вывели медицину на новый уровень и помогли спасти бесчисленное количество жизней, однако «золотая эра антибиотиков» продлилась недолго. В настоящее время устойчивость к противомикробным препаратам угрожает самым основам современной медицины [1], и в ближайшие десятилетия множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) может стать более частой причиной смерти, чем рак [2].

Особенно остро эта проблема встала в связи с возникшей пандемией коронавируса SARS-CoV-2, когда лечение в стационаре заболеваний с разной и смешанной этиологией может служить триггером ускорения образования антибиотикорезистентных госпитальных штаммов. Результаты многих исследований свидетельствуют в пользу существования прямой зависимости между увеличением потребления антибиотиков и распространением устойчиво-

сти бактерий к их действию [3–5], а в результате глобализации экономики антибиотикорезистентность стремительно распространяется по всему миру.

Между тем поиск новых антибиотиков сильно замедлился. Несмотря на острую потребность в противомикробных средствах, в настоящее время разрабатывается очень мало новых соединений, большинство из которых к тому же принадлежат к классам уже используемых антибиотиков [6]. За последние 15 лет лишь один новый класс антибиотиков против грамположительных бактерий был введен в клиническую практику, а последний класс антибиотиков широкого спектра действия был введен в клинику в 60-х гг. прошлого века [7]. Таким образом, человечество стоит на грани глобального кризиса и может быть отброшено назад в доантибиотическую эпоху.

Тем не менее, явление антибиотикорезистентности не ново. Бактерии конкурировали между собой задолго до появления эукариот, и существуют

доказательства наличия генов, кодирующих устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, тетрациклину и гликопептидным антибиотикам в ДНК бактерий, которые находились в древнем пермафросте возрастом 30 тыс. лет [8]. То, как быстро бактериям удастся приспособливаться к новым антибиотикам, свидетельствует о многообразии и сложности их механизмов защиты. Некоторые из них могут быть обусловлены генетическими факторами (случайная мутация, передающаяся в популяции), а некоторые — особыми состояниями (персистенция, нахождение в глубоких слоях биопленки), где клетки являются нечувствительными к действию антибиотиков. Основными механизмами резистентности на данный момент считаются ограничение поглощения лекарственного средства, модификация его мишени, инаktivация лекарственного средства и активный его выброс, а также переключение мишеней и удаление мишени [7, 9]. Кроме того, защита бактерий может быть специфической (направленной против конкретного класса антибиотиков или конкретного антибиотика) и неспецифической (направленной против широкого спектра антибактериальных веществ), а также включать формирование метаболических шунтов — обходных путей, позволяющих не задействовать молекулу-мишень антибиотика.

## 2. Неспецифическая защита

Хотя понятие неспецифической защиты, или иммунитета, присуще сложноорганизованным многоклеточным организмам, на клеточном уровне она осуществляется и у бактерий. У животных — например, млекопитающих — основные системы защиты локализованы на коже и слизистых оболочках и представляют собой секреты слизистых, слюнных или слюнных желез, а также желудочный сок. Клетки иммунной системы способны распознавать и уничтожать патогены, что создает мощный барьер между организмом и внешней средой. Главная задача подобной защиты — не пропустить патогенный организм внутрь, а если это по каким-то причинам не удалось, начать воспалительный ответ. При этом животные имеют в своем арсенале также высокоэффективный специфический иммунитет, что делает их способными противостоять различным инфекциям вирусной, бактериальной и грибковой природы [10].

В отличие от животных, растения полагаются на врожденный иммунитет каждой клетки и системные сигналы, исходящие из очагов инфекции, а не на мобильные защитные клетки и соматическую адаптивную иммунную систему. Однако даже при этом заражение патогенными микроорганизмами не всегда бывает успешным для бактерий из-за структурных изменений клеточной стенки или запрограммированной гибели клеток [11]. Клеточная стенка растений состоит из микрофибрилл целлюлозы и гемицеллюлозы; она

армирована лигнином и содержит значительное количество белков, выполняющих структурные и ферментативные функции [12]. Неоднородность строения клеточной стенки растений вынуждает патогены использовать различные стратегии проникновения через нее.

Несмотря на то, что бактерии представляют собой одноклеточные организмы, им также присущи элементы неспецифической защиты. У бактерий имеется особое состояние псевдомногоклеточности — биопленки, когда клетки популяции находятся в различном метаболическом, экспрессионном и энергетическом состоянии, образуя сложный конгломерат клеток, выполняющих защитную и адаптивную функцию. Состояние биопленки позволяет бактериальной популяции эффективно противостоять антибиотикам, но в то же время делает ее крайне уязвимой для вирусных инфекций, вызванных бактериофагами. При этом роль неспецифической защиты выполняют помпы МЛУ, которые и определяют способность индивидуальных клеток противостоять в войне антибиотиков, длящейся многие миллионы лет [13, 14]: по-видимому, еще со времен возникновения LUCA (Last Universal Common Ancestor), последнего общего предка всех живых существ на Земле [15].

## 3. Основной компонент неспецифической защиты бактерий — помпы множественной лекарственной устойчивости

Как было сказано выше, немаловажную роль в неспецифической защите играют помпы МЛУ. Они высокоэффективны и широко специфичны, что обеспечивает бактериям защиту от большого разнообразия ксенобиотиков. При этом надо учитывать, что помпы МЛУ присутствуют во всех живых клеточных организмах без исключения и являются важнейшим элементом не только бактериальной неспецифической клеточной защиты.

Вклад помп МЛУ в бактериальную резистентность до настоящего времени не оценен по достоинству. Это можно проиллюстрировать на примере митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1. Еще недавно считалось, что он не является антибиотиком [16]. При обнаружении его антибактериальных свойств решили, что чувствительность бактерий к SkQ1 определяется его способностью к проникновению через сложно устроенную клеточную стенку, поэтому грамположительные *Bacillus subtilis* были чувствительны к SkQ1, тогда как грамотрицательные *Escherichia coli* — нет [17]. Дальнейшие исследования показали [18], что делеция белков помпы AcrAB-TolC приводит к полной потере устойчивости к SkQ1 [19]. AcrAB-TolC является основной помпой оттока множества антибиотиков [20], так что легко может показаться, что устойчивость грамотрицательных бактерий обу-

словлена не сложностью проникновения вещества через две мембраны, а наличием помпы, эффективно откачивающей его. Однако это тоже являлось слишком простым объяснением. Оказалось, что грамотрицательные бактерии *Rhodobacter sphaeroides* и *Photobacterium phosphoreum*, чувствительные к SkQ1, имеют белки-компоненты помпы AcrAB-TolC [18, 19], что сводит на нет гипотезу о наличии ее как необходимого и достаточного условия резистентности. Выяснилось, что аминокислотные последовательности белка AcrB из *E. coli*, *R. sphaeroides* и *P. phosphoreum* сходны на 35–60% и формально являются филогенетическими гомологами (ортологами), но они не гомологичны функционально и должны рассматриваться как паралоги [21, 22]. Это подтверждается тем, что в случае *Klebsiella pneumoniae* при гомологии 91,5% наблюдается филогенетическая и функциональная гомология, свойственная большинству ортологов [19, 21].

Очевидно, что в процессе исследований механизм резистентности к SkQ1 был принят за ограничение его поглощения посредством сложной клеточной стенки, тогда как на самом деле он был основан на активном выбросе лекарственного средства помпой МЛУ.

Проблемы с определением механизмов резистентности в каждом конкретном случае связаны с недостаточным изучением антибиотиков, а также плеiotропией действия помп. Множество помп могут откачивать один и тот же антибиотик, и удаление даже нескольких из них незначительно влияет на общий эффект. Если посмотреть на профиль чувствительности *E. coli* к антибиотикам по их оттоку [23], можно увидеть, что механизм «активный выброс лекарственного средства» приводит к увеличению минимальной ингибирующей концентрации для антибиотиков в 50–100 раз, и этот же порядок величин мы наблюдаем в случае SkQ1 [18]. Даже в том случае, когда проницаемость сквозь наружную мембрану, по-видимому,

затруднена, как в случае с BACE (хлорин еб 13(1)-N-{2-[N-(1-карба-клозо-додекарборан-1-ил)метил]аминоэтил}амид-15(2), 17), конъюгата хлорина еб и карборана [24], действие помп все же можно заметить [25]. Таким образом, помпы МЛУ, по-видимому, играют ключевую, но недооцененную роль в резистентности к антибиотикам.

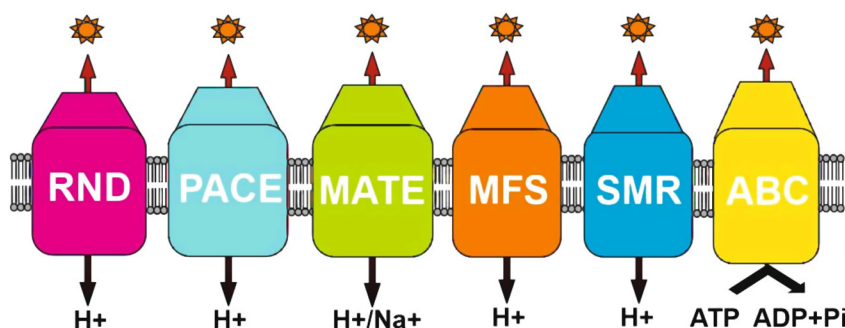
#### 4. Структура помп

##### множественной лекарственной устойчивости

К настоящему времени было выявлено шесть семейств помп МЛУ [26]. Одно из них – семейство ABC-транспортеров (ATP-binding cassette), напрямую использующих энергию АТФ для осуществления транспорта. Остальные пять семейств – вторичные активные транспортеры, использующие электрохимическую энергию трансмембранного потенциала, к ним относятся MFS (major facilitator superfamily), MATE (multidrug and toxin extrusion), SMR (small multidrug resistance), RND (resistance-nodulation-cell division) и PACE (proteobacterial antimicrobial compound efflux). На рис. 1 представлена схема работы основных семейств бактериальных транспортеров.

По-видимому, два разных механизма работы транспортеров предназначены для поддержания жизнеспособности клетки в разных физиологических состояниях. При отсутствии потенциала на мембране (например, в состоянии персистенции) будут функционировать только ABC-транспортеры, а при наличии трансмембранного потенциала будут работать все транспортеры. У прокариот преобладают потенциал-зависимые помпы, что объясняется высоким потенциалом на мембране (~140–220 mV для *E. coli* [27]) и отсутствием необходимости конвертации потенциала в АТФ, что дает преимущество по скорости работы.

Одной из наиболее изученных помп МЛУ является помпа AcrAB-TolC (или AcrABZ-TolC) бактерии *E. coli* [28]. Эта помпа состоит из трех



**Рис. 1.** Схематическое представление принципов работы известных семейств помп МЛУ. К настоящему моменту выявлено шесть семейств помп МЛУ. Из них лишь семейство ABC-транспортеров (ATP-binding cassette) напрямую использует энергию АТФ для осуществления транспорта, остальные пять семейств – вторичные активные транспортеры, которые используют электрохимическую энергию трансмембранного потенциала, к ним относятся суперсемейство MFS (major facilitator superfamily), семейство MATE (multidrug and toxin extrusion), семейство SMR (small multidrug resistance), суперсемейство RND (resistance-nodulation-cell division) и семейство PACE (proteobacterial antimicrobial compound efflux).

основных белков: канала наружной мембраны TolC, транспортера AcrB и соединяющего их адаптерного белка AcrA [29], а также одного небольшого мембранного белка AcrZ (YbhT), состоящего из 49 аминокислотных остатков, и, по-видимому, модулирующего работу белка AcrB в составе помпы AcrAB-TolC [30–32]. Интересно, что канал TolC играет ту же самую роль для еще 7 помп МЛЮ семейств RND, ABC и MFS [15], а адаптерный белок AcrA — для еще одной помпы AcrAD-TolC [33]. Помпа AcrAB-TolC имеет довольно большую субстратную специфичность и откачивает субстраты из внутренней мембраны бактерии и периплазматического пространства [23, 29, 34]. Сам транспортер AcrB находится на внутренней мембране и прокачивает вещества за счет трансмембранного потенциала, однако механизм действия помпы AcrAB-TolC окончательно не установлен, хотя в литературе имеются несколько работ, предполагающих отдельные этапы этого процесса [35–40].

#### **5. Эволюция помп множественной лекарственной устойчивости и горизонтальный перенос генов**

Об эволюционной консервативности помп свидетельствует повсеместное распространение помп семейств MFS и RND как среди прокариот (включая бактерий и архей), так и среди эукариот [41, 42], поэтому консервативность помп в пределах одного вида не удивительна [43]. Это также подтверждается тем фактом, что структуры помп выбирались бактериофагами в качестве мишеней для своего связывания [44, 45]. Способность обеспечивать отток лекарств, по-видимому, появлялась всего несколько раз в ходе эволюции и стабильно сохранялась, но при этом модуляция специфичности субстрата этих систем происходила неоднократно [46].

Хотя некоторые семейства помп распространены достаточно широко, существуют проблемы, которые затрудняют горизонтальный перенос генов помп даже между близкими таксонами. Различия в белковом строении внешней мембраны бактерий накладывают определенные ограничения, однако это явление может вносить весьма важный вклад в распространение антибиотикорезистентности. Несмотря на это, различные компоненты помп или даже сами помпы могут передаваться в результате горизонтального переноса генов. Так, гены помпы OqxAB обычно локализованы на хромосоме и/или плаزمиде, окруженных IS26-подобными мобильными генетическими элементами в клинических изолятах *Enterobacteriaceae* и придают устойчивость к хиноксалинам, хинолонам, тигециклину, нитрофурантоину, нескольким детергентам и дезинфицирующим средствам [47, 48]. Было показано [49], что помпа OqxAB придает устойчивость к противомикроб-

ным препаратам или снижает восприимчивость трансформированных бактерий (перенос плазмиды с *E. coli* осуществлялся на *Salmonella typhimurium*, *K. pneumoniae*, *Kluyvera sp.* и *Enterobacter aerogenes*) к различным субстратам. OqxAB — одна из немногих помп, закодированных на конъюгативных плаزمиде. Другим подобным примером является помпа MexCD [50]. Таким образом, помпы МЛЮ и их компоненты могут передаваться горизонтально между близкими группами бактерий, однако способность их к передаче функции помпы может быть сильно ограничена и требовать наличия подходящих белковых компонентов — таких, как, например, белок TolC для помпы OqxAB [51].

#### **6. Роль помп множественной лекарственной устойчивости в антибиотикорезистентности**

Помпы МЛЮ являются универсальным инструментом, защищающим саму бактериальную клетку и ее микроокружение от негативного воздействия ксенобиотиков, в том числе от множества самых разнообразных антибиотиков [15]. Более того, бактерии используют различные подходы для повышения ее эффективности. Резистентные фенотипы могут возникать в результате усиления активности помп за счет их сверхэкспрессии, как это наблюдается при добавлении антибиотиков в сублетальных концентрациях, когда за счет каскада взаимодействий индуцируется увеличение экспрессии генов помп МЛЮ, откачивающих эти антибиотики [52].

Другим интересным аспектом является асимметричное расположение помп МЛЮ в ходе клеточного деления. В процессе деления ранее синтезированные помпы в основном находятся на старых полюсах, а новые полюса вновь создаются, и помпы МЛЮ синтезируются *de novo* [53]. Это создает изменчивый профиль резистентности в процессе клеточного цикла, что дает возможность популяции сохранять в своем составе бактерии с разным статусом экспрессии помп МЛЮ. При встрече с антибиотиком наименее устойчивые клетки погибают и задействуют две стратегии: адсорбирование на поверхности умерших клеток антимикробных препаратов, что защищает оставшиеся бактерии [54, 55], и выделение «некросигнала» умершими клетками, вызывающим активацию защитных путей у выживших бактерий [56]. Удивительно, что в качестве «некросигнала» выступает компонент помпы AcrAB-TolC, адаптерный белок AcrA, в результате чего бактериальная популяция приобретает повышенную устойчивость к антибиотикам. Кроме того, под воздействием антибиотиков скорость мутаций определенных генов может увеличиваться [57, 58]. Изменение числа копий гена происходит весьма часто в геномах [59], и удвоение генов помп МЛЮ приводит к повышению шансов выживания бак-

терий при добавлении антибиотиков. Таким образом, удвоение гена приводит к увеличению резистентности и может являться альтернативой изменения уровня экспрессии.

Резюмируя вышеперечисленное, можно заключить, что бактерии в полной мере используют все возможности, представляемые им помпами МЛУ для увеличения резистентности, и это защищает их даже при высоких концентрациях антибиотиков.

## 7. Роль помп

### множественной лекарственной устойчивости в образовании биопленок и клеток-персистеров

Бактериальная популяция обычно существует в виде двух субпопуляций, планктонной и прикрепленной. Между ними существует равновесие, поддерживаемое разными факторами, такими как сигналы чувства кворума [60] или электрические сигналы [61]. Устойчивость бактерий в составе биопленок может на два порядка превышать устойчивость планктонных форм [62]. Биопленки могут формироваться бактериями разных видов, что имеет свои преимущества — как в метаболическом плане, так и в плане защиты [63, 64].

При этом роль помп МЛУ в формировании биопленок довольно значительна. Это транспортировка компонентов внеклеточного матрикса за пределы клетки для формирования защиты, экспорт сигналов чувства кворума, предотвращение или способствование адгезии к другим клеткам и субстратам, а также защита от токсинов, антибиотиков и метаболитов, возникающих в результате совместного нахождения в ограниченном объеме биопленки [15].

Другими механизмами защиты от антибиотиков можно считать абсорбцию антибиотиков бактериальными клетками на границе биопленки, смерть которых является одновременно и защитой [54, 55], и источником питательных ресурсов для популяции внутри биопленки за счет так называемого некротрофического роста [65]. Таким образом, помпы МЛУ не только играют важную роль, откачивая антибиотики из клеток, но и создают определенное микроокружение, влияющее на всю популяцию вокруг [66].

Условия, создаваемые в биопленках, защищают бактерии от воздействий внешней среды, но в то же время это ограничивает доступ к питательным веществам, из-за чего стационарная фаза роста наступает быстрее. Доля метаболически неактивных клеток-персистеров в популяции увеличивается, клетки начинают тормозить свой метаболизм, поэтому недостаток питательных веществ в глубоких слоях биопленки способствует формированию персистенции [67, 68].

Так как одним из механизмов персистенции является деполаризация мембраны под действием токсина TisB [69–71], можно полагать, что имен-

но в этом случае возникает состояние, когда клетка бывает лишена потенциала на мембране и, получив энергию за счет мембранонезависимых энергетических процессов (например, гликолиза), может использовать АТФ-зависимые помпы для откачки вредных веществ, когда остальные помпы отключены из-за отсутствия потенциала на мембране.

Таким образом, помпы МЛУ играют важную роль не только в защите клетки от антибиотиков, но и в процессах образования сложных структур, таких как биопленки, и в реализации особого клеточного состояния персистенции, которое позволяет бактериям повышать на несколько порядков резистентность к антибиотикам и даже избегать их воздействия, не имея генетических детерминант специфической защиты.

## 8. Заключение

Можно полагать, что помпы МЛУ являются краеугольным камнем резистентности и необходимы для многих клеточных процессов у бактерий. Помпы играют ключевую роль в процессах защиты и нападения за счет участия в экспорте токсинов, участвуют в образовании биопленок и вносят важный вклад в бактериальную персистенцию, поддержание клеточного гомеостаза и даже являются рецепторами, обуславливающими проникновение бактериофагов в клетку (рис. 2).



### Помпы множественной лекарственной устойчивости

**Рис. 2.** Роль помп МЛУ в процессах бактериальной клетки. Помпы могут выполнять как защитную функцию, так и функцию активного нападения, поддерживать гомеостаз клетки и даже быть рецепторами, опосредующими проникновение бактериофагов в клетку.

Даже при отсутствии специализированных систем защиты от антибиотиков само наличие этих сложно регулируемых систем обеспечивает высокий уровень защиты, позволяющий бактериям выживать при концентрациях антибиотика на несколько порядков выше потенциально смертельного. Это дает возможность заключить, что система помп МЛЮ бактерий представляет собой неспецифическую защиту от ксенобиотиков, которая и обуславливает базовую, первичную резистентность, «иммунитет» бактерий к токсинам, антибиотикам и другим веществам, негативно влияющим на бактериальную клетку. Другие механизмы резистентности (модификация мишени лекарственного средства, инактивация лекарственного средства, переключение мишеней и секвестрация мишеней) являются вторичными, специфическими механизмами, которые при совместной работе с первичной системой и опреде-

ляют существование феномена «суперустойчивых» бактерий. Долгосрочную стратегию борьбы с такими бактериями невозможно осуществить только лишь за счет обхождения специфической защиты без уделения должного внимания преодолению неспецифической защиты. Исследование и понимание этих процессов позволит нам либо серьезно отсрочить наступление постантибиотической эры, либо даже не допустить ее наступления в будущем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00099 «Создание гетерологической системы помп МЛЮ для исследования бактериальной резистентности патогенных грамотрицательных бактерий») и проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. 2015. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763> (дата обращения: 15.06.2022).
2. World Health Organization. 2014. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642> (дата обращения: 15.06.2022).
3. Arason V.A., Gunnlaugsson A., Sigurdsson J.A., Erlendsdottir H., Gudmundsson S., Kristinsson K.G. Clonal spread of resistant pneumococci despite diminished antimicrobial use // *Microb. Drug Resist.* 2002. Vol. 8. N 3. P. 187–192.
4. *Antimicrobial Resistance Collaborators*. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet*. 2022. Vol. 399 N 10325. P. 629–655.
5. Turner B. Tackling antimicrobial resistance and climate change // *Lancet*. 2018. Vol. 299. N 10163. P. 2435–2436.
6. Cooper M.A., Shlaes D. Fix the antibiotics pipeline // *Nature*. 2011. Vol. 472. N 7341. P. 32.
7. Lewis K. The science of antibiotic discovery // *Cell*. 2020. Vol. 181. N 1. P. 29–45.
8. D'Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R., Golding G.B., Poinar H.N., Wright G.D. Antibiotic resistance is ancient // *Nature*. 2011. Vol. 477. N 7365. P. 457–461.
9. Reygaert W.C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria // *AIMS Microbiol.* 2018. Vol. 4. N 3. P. 482–501.
10. Chaplin D.D. Overview of the immune response // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. Vol. 125. N 2. P. 3–23.
11. Nazarov P.A., Baleev D.N., Ivanova M.I., Sokolova L.M., Karakozova M.V. Infectious plant diseases: Etiology, current status, problems and prospects in plant protection // *Acta Naturae*. 2020. Vol. 12 N 3. P. 46–59.
12. Смирнова О.Г., Кочетов А.В. Клеточная стенка растений и механизмы устойчивости к патогенам // *Вавил. журн. ген. селекц.* 2016. Т. 6. № 19. С. 715–723.
13. Nikaido H. RND transporters in the living world // *Res. Microbiol.* 2018. Vol. 169. N 7–8. P. 363–371.
14. Pasqua M., Grossi M., Zennaro A., Fanelli G., Micheli G., Barras F., Colonna B., Prosseda G. The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria with animal and plant cells // *Microorganisms*. 2019. Vol. 7. N 9: 285.
15. Nazarov P.A. MDR Pumps as crossroads of resistance: Antibiotics and Bacteriophages // *Antibiotics*. 2022. Vol. 11. N 6: 734.
16. Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S., et al. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents // *Aging*. 2011. Vol. 3. N 11. P. 1110–1119.
17. Khailova L.S., Nazarov P.A., Sumbatyan N.V., Korshunova G.A., Rokitskaya T.I., Dedukhova V.I., Antonenko Y.N., Skulachev V.P. Uncoupling and toxic action of alkyltriphenylphosphonium cations on mitochondria and the bacterium *Bacillus subtilis* as a function of alkyl chain length // *Biochemistry (Mosc.)*. 2015. Vol. 80. N 12. P. 1589–1597.
18. Nazarov P.A., Osterman I.A., Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. N 1: 1394.
19. Nazarov P.A., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. Genetic variability of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump underlies SkQ1 resistance in gram-negative bacteria // *Acta Naturae*. 2019. Vol. 11. N 4. P. 93–98.
20. Shi X., Chen M., Yu Z., Bell J.M., Wang H., Forrester I., Villarreal H., Jakana J., Du D., Luisi B.F., Ludtke S.J., Wang Z. In situ structure and assembly of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10. N 1: 2635.
21. Nazarov P.A., Sorochkina A.I., Karakozova M.V. New functional criterion for evaluation of homologous MDR pumps // *Front. Microbiol.* 2020. Vol. 11: 592283.
22. García-Contreras R., Martínez-Vázquez M., González-Pedrajo B., Castillo-Juárez I. Editorial: Alternatives to combat bacterial infections // *Front. Microbiol.* 2022. Vol. 13: 909866.

23. Sulavik M.C., Houseweart C., Cramer C., Jiwani N., Murgolo N., Greene J., DiDomenico B., Shaw K.J., Miller G.H., Hare R., Shimer G. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45. N 4. P. 1126–1136.
24. Moisenovich M.M., Ol'shevskaya V.A., Rokitskaya T.I., Ramonova A.A., Nikitina R.G., Savchenko A.N., Tatarskiy V.V. Jr., Kaplan M.A., Kalinin V.N., Kotova E.A., Uvarov O.V., Agapov I.I., Antonenko Y.N., Shtil A.A. Novel photosensitizers trigger rapid death of malignant human cells and rodent tumor transplants via lipid photodamage and membrane permeabilization // *PloS One*. 2010. Vol. 5. N 9: e12717.
25. Omarova E.O., Nazarov P.A., Firsov A.M., Strakhovskaya M.G., Arkhipova A.Y., Moisenovich M.M., Agapov I.I., Ol'shevskaya V.A., Zaitsev A.V., Kalinin V.N., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Carboranyl-chlorin e6 as a potent antimicrobial photosensitizer // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. N 11: e0141990.
26. Du D., Wang-Kan X., Neuberger A., van Veen H.W., Pos K.M., Piddock L.J.V., Luisi B.F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation // *Nat. Rev. Microbiol.* 2018. Vol. 16. N 9. P. 523–539.
27. Bot C., Prodan C. Quantifying the membrane potential during *E. coli* growth stages // *Biophys. Chem.* 2010. Vol. 146. P. 133–137.
28. Du D., Wang Z., James N.R., Voss J.E., Klimont E., Ohene-Agyei T., Venter H., Chiu W., Luisi B.F. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump // *Nature*. 2014. Vol. 509. N 7501. P. 512–515.
29. Yu E. W., Aires J.R., Nikaido H. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185. N 19. P. 5657–5664.
30. Hobbs E.C., Yin X., Paul B.J., Astarita J.L., Storz G. Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. Vol. 109. N 41. P. 16696–16701.
31. Storz G., Wolf Y.I., Ramamurthi K.S. Small proteins can no longer be ignored // *Annu. Rev. Biochem.* 2014. Vol. 83. P. 753–777.
32. Du D., Neuberger A., Orr M.W., Newman C.E., Hsu P.C., Samsudin F., Szweczek-Harris A., Ramos L.M., Debela M., Khalid S., Storz G., Luisi B.F. Interactions of a bacterial RND transporter with a transmembrane small protein in a lipid environment // *Structure*. 2020. Vol. 28. N 6. P. 625–634.
33. Rosenberg E.Y., Ma D., Nikaido H. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump // *J. Bacteriol.* 2000. Vol. 182. N 6. P. 1754–1756.
34. Pos K.M. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1794. N 5. P. 782–793.
35. Seeger M.A., Schiefner A., Eicher T., Verrey F., Diederichs K., Pos K.M. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism // *Science*. 2006. Vol. 313. N 5791. P. 1295–1298.
36. Nikaido H., Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps // *Biochim. Biophys. Acta* 2009. Vol. 1794. N 5. P. 769–781.
37. Eicher T., Cha H.J., Seeger M.A., Brandstätter L., El-Delik J., Bohnert J.A., Kern W.V., Verrey F., Grütter M.G., Diederichs K., Pos K.M. Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. Vol. 109. N 15. P. 5687–5692.
38. Husain F., Nikaido H. Substrate path in the AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 2010. Vol. 78. N 2. P. 320–330.
39. Tam H.K., Foong W.E., Oswald C., Herrmann A., Zeng H., Pos K.M. Allosteric drug transport mechanism of multidrug transporter AcrB // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12. N 1: 3889.
40. Webber A., Ratnaweera M., Harris A., Luisi B.F., Ntsogo Enguéné V.Y. A model for allosteric communication in drug transport by the AcrAB-TolC tripartite efflux pump // *Antibiotics*. 2022. Vol. 11. N 1: 52.
41. Sandhu P., Akhter Y. Evolution of structural fitness and multifunctional aspects of mycobacterial RND family transporters // *Arch. Microbiol.* 2018. Vol. 200. N 1. P. 19–31.
42. Pasqua M., Bonaccorsi di Patti M.C., Fanelli G., Utsumi R., Eguchi Y., Trirocco R., Prosseda G., Grossi M., Colonna B. Host-bacterial pathogen communication: The wily role of the multidrug efflux pumps of the MFS family // *Front. Mol. Biosci.* 2021. Vol. 8: 723274.
43. Karakozova M., Nazarov P. Conserved sequences of genes coding for the multidrug resistance pump AcrAB-TolC of *Escherichia coli* suggest their involvement into permanent cell “cleaning” // *Bull. Russ. State Med. Univ.* 2018. N. 2. P. 32–36.
44. Tamer Y.T., Gaszek I., Rodrigues M., Coskun F.S., Farid M., Koh A.Y., Russ W., Toprak E. The antibiotic efflux protein TolC is a highly evolvable target under Colicin E1 or TLS phage selection // *Mol. Biol. Evol.* 2021. Vol. 38. N 10. P. 4493–4504.
45. Esteves N.C., Porwollik S., McClelland M., Scharf B.E. The multidrug efflux system AcrABZ-TolC is essential for infection of *Salmonella typhimurium* by the flagellum-dependent bacteriophage Chi // *J. Virol.* 2021. Vol. 95. N 11: e00394-21.
46. Saier M.H. Jr., Paulsen I.T., Sliwinski M.K., Pao S.S., Skurray R.A., Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria // *FASEB J.* 1998. Vol. 12. N 3. P. 265–274.
47. Hansen L.H., Jensen L.B., Sørensen H.I., Sørensen S.J. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. Vol. 60. N 1. P. 145–147.
48. Harmer C.J., Hall R.M. An analysis of the IS6/IS26 family of insertion sequences: is it a single family? // *Microb. Genom.* 2019. Vol. 5. N. 9: e000291.
49. Li J., Zhang H., Ning J., Sajid A., Cheng G., Yuan Z., Hao H. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump // *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2019. Vol. 8: 44.
50. Tauch A., Schlüter A., Bischoff N., Goesmann A., Meyer F., Pühler A. The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 beta backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene bla(NPS-1), and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family // *Mol. Genet. Genom.* 2003. Vol. 268. N 5. P. 570–584.
51. Sato T., Yokota S., Uchida I., Okubo T., Usui M., Kusumoto M., Akiba M., Fujii N., Tamura Y. Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia*

*coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations // *Front. Microbiol.* 2013. Vol. 4: 125.

52. Nichols R.J., Sen S., Choo Y.J., Beltrao P., Zietek M., Chaba R., Lee S., Kazmierczak K.M., Lee K.J., Wong A., Shales M., Lovett S., Winkler M.E., Krogan N.J., Typas A., Gross C.A. Phenotypic landscape of a bacterial cell // *Cell*. 2011. Vol. 144. N 1. P. 143–156.

53. Bergmiller T., Andersson A.M.C., Tomasek K., Balleza E., Kiviet D.J., Hauschild R., Tkačik G., Guet C.C. Biased partitioning of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC underlies long-lived phenotypic heterogeneity // *Science*. 2017. Vol. 356. N 6335. P. 311–315.

54. Snoussi M., Talledo J.P., Del Rosario N.A., Mohammadi S., Ha B.Y., Košmrlj A., Taheri-Araghi S. Heterogeneous absorption of antimicrobial peptide LL37 in *Escherichia coli* cells enhances population survivability // *eLife*. 2018. Vol. 7: e38174.

55. Wu F., Tan C. Dead bacterial absorption of antimicrobial peptides underlies collective tolerance // *J. R. Soc. Interface*. 2019. Vol. 16. N 151: 20180701.

56. Bhattacharyya S., Walker D.M., Harshey R.M. Dead cells release a «necrosignal» that activates antibiotic survival pathways in bacterial swarms // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11. N 1: 4157.

57. Björkholm B., Sjölund M., Falk P.G., Berg O.G., Engstrand L., Andersson D.I. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. N 25. P. 14607–14612.

58. Long H., Miller S.F., Strauss C., Zhao C., Cheng L., Ye Z., Griffin K., Te R., Lee H., Chen C.C., Lynch M. Antibiotic treatment enhances the genome-wide mutation rate of target cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. Vol. 113. N 18: E2498–505.

59. Reams A.B., Roth J.R. Mechanisms of gene duplication and amplification // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015. Vol. 7. N 2: a016592.

60. Mukherjee S., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. Vol. 17. N 6. P. 371–382.

61. Humphries J., Xiong L., Liu J., Prindle A., Yuan F., Arjes H.A., Tsimring L., Süel G.M. Species-independent

attraction to biofilms through electrical signaling // *Cell*. 2017. Vol. 168. N 1–2. P. 200–209.

62. Wu H., Moser C., Wang H.Z., Høiby N., Song Z.J. Strategies for combating bacterial biofilm infections // *Int. J. Oral Sci.* 2015. Vol. 7. N 1. P. 1–7.

63. Sharma D., Misba L., Khan A.U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities // *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2019. Vol. 8: 76.

64. Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 14. N 9. P. 563–575.

65. Wang Z., Gong X., Xie J., Xu Z., Liu G., Zhang G. Investigation of formation of bacterial biofilm upon dead siblings // *Langmuir*. 2019. Vol. 35. N 23. P. 7405–7413.

66. Wen X., Langevin A.M., Dunlop M.J. Antibiotic export by efflux pumps affects growth of neighboring bacteria // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8: 15120.

67. Lewis K. Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. Vol. 64. P. 357–372.

68. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnell R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan B.E., Singh P.K. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria // *Science*. 2011. Vol. 334. N 6058. P. 982–986.

69. Dörr T., Vulić M., Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli* // *PLoS Biol.* 2010. Vol. 8. N 2: e1000317.

70. Berghoff B.A., Hoekzema M., Aulbach L., Wagner E.G. Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation // *Mol. Microbiol.* 2017. Vol. 103. N 6. P. 1020–1033.

71. Edelmann D., Leinberger F.H., Schmid N.E., Oberpaul M., Schäberle T.F., Berghoff B.A. Elevated expression of toxin TisB protects persister cells against ciprofloxacin but enhances susceptibility to mitomycin C // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9. N 5: 943.

Поступила в редакцию 17.06.2022

После доработки 05.10.2022

Принята в печать 26.10.2022

## REVIEW

# Multidrug resistance pumps as a keystone of bacterial resistance

P.A. Nazarov<sup>1</sup>, \* , A.M. Kuznetsova<sup>2</sup> , M.V. Karakozova<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Department of Bioenergetics, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–43 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia;

<sup>2</sup>Department of Microbiology, School of Biology,

Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

<sup>3</sup>Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, 30–1 Bolshoy Boulevard, 121205, Moscow, Russia

\*e-mail: nazarovpa@gmail.com

Antibiotic resistance is a global problem of modern medicine. A harbinger of the onset of the post-antibiotic era is the complexity and high cost of developing new antibiotics, as well as their inefficiency due to the rapidly developing resistance of bacteria. The cornerstone of bacterial protection against antibiotics are multidrug resistance pumps (MDR), which are involved in the

formation of resistance to xenobiotics, the export of toxins, the maintenance of cellular homeostasis, the formation of biofilms and persistent cells. MDR pumps are the basis for the nonspecific protection of bacteria, while modification of the drug target, inactivation of the drug, switching of the target or sequestration of the target is the second, specific line of their protection. Thus, the nonspecific protection of bacteria formed by MDR pumps is a barrier that prevents the penetration of antibacterial substances into the cell, which is the main factor determining the resistance of bacteria. Understanding the mechanisms of MDR pumps and a balanced assessment of their contribution to overall resistance, as well as to antibiotic sensitivity, will either seriously delay the onset of the post-antibiotic era, or prevent its onset in the foreseeable future.

**Keywords:** *multidrug resistance (MDR), pumps, antibiotics, xenobiotics, biofilms, persisters, bacteriophages*

**Funding:** The research was funded by Russian Science Foundation, project number № 22-15-00099.

#### Сведения об авторах

*Назаров Павел Александрович* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИИ ФХБ им А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-51-49; e-mail: nazarovpa@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1857-323X>

*Кузнецова Анна Михайловна* — студентка кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-49; e-mail: nycterix@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0450-5183>

*Каракозова Марина Викторовна* — канд. биол. наук, науч. сотр. Сколковского института науки и технологий. Тел.: 8-495-939-51-49; e-mail: mvk752002@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9404-6314>

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.551+597.55+57.184

**Выбор партнера по размножению и размерная ассортативность  
спаривания у рыбы-ползуна  
*Anabas testudineus* (Actinopteri: Anabantidae)****Д.Д. Зворыкин** 

Лаборатория поведения низших позвоночных, Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова,  
Российская академия наук, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33  
e-mail: d.zworykin@gmail.com

Неслучайный выбор партнера по размножению играет важную роль как в процессах видообразования, так и в жизненной стратегии конкретной особи. Один из ключевых критериев выбора — размер тела. У рыб известны различные типы размерной избирательности партнеров, однако исследован этот компонент репродуктивной стратегии только у небольшого числа видов. Несмотря на широкое распространение и известность рыбы-ползуна (*Anabas testudineus*), опубликовано лишь несколько описаний его нереста, причем только в неволе и в большинстве случаев — искусственно стимулированного с помощью гормональных препаратов. В данной работе описаны основные особенности естественного нереста ползуна в аквариумных условиях в сравнении с индуцированным нерестом. Выявлена положительная размерная ассортативность при первоначальном выборе самкой анабаса партнера по размножению, а также показано, что брачная система этих рыб характеризуется пластичностью, варьируя от предположительной моногамии до полигамии. Полученные результаты обсуждаются в контексте общей проблемы адекватности методов исследования поведения рыб.

**Ключевые слова:** рыба-ползун, *Anabas testudineus*, выбор партнера по размножению, ассортативность спаривания, размерные предпочтения, естественный нерест

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-224-230

У многих животных выбор партнера по размножению осуществляется неслучайным образом, на основе тех или иных предпочтений [1]. Выделяют различные типы неслучайного спаривания, среди которых одним из важнейших является ассортативное спаривание, понимаемое как корреляция между фенотипическими признаками самцов и самок в размножающихся парах [2, 3]. При положительной ассортативности формируются пары, максимально сходные по определенным чертам фенотипа, а при отрицательной — максимально различающиеся. Второй широко распространенный паттерн неслучайного выбора партнера основан на предпочтении наличия и выраженности какого-либо признака [4, 5]. Такой признак не всегда непосредственно влияет на повышение приспособленности, но может выполнять сигнальную функцию [6].

Все формы неслучайного спаривания играют важную роль как в процессах видообразования, так и в жизненной стратегии конкретной особи [7, 8]. Один из ключевых критериев выбора партнера — это размер тела [9, 10]. Если при положительной ассортативности мелкие особи предпочитают мелких потенциальных партнеров, а круп-

ные крупных, то в случае предпочтения признака животные любого размера будут стремиться образовывать пару с наиболее крупным индивидуумом противоположного пола. Предполагается, что при наличии выбора и при отсутствии ограничений животное предпочитает крупного партнера, поскольку размер тела коррелирует с приспособленностью. Однако соразмерность также имеет ряд плюсов и потенциальных преимуществ, влияющих на выбор [11, 12].

У рыб известны оба типа выбора партнера по нересту [13, 14], но у многих видов они остаются неизученными. Один из таких видов — анабас, или рыба-ползун (*Anabas testudineus*). Анабасы широко распространены в пресных водах Южной и Юго-Восточной Азии и являются популярным объектом рыбоводства, однако их нерест в неволе описан лишь в нескольких публикациях [15–18], а в природе не описан вовсе. Известно, что ползуны нерестятся парами, при этом во время нереста может происходить смена партнеров. Информация о том, как формируются пары, в литературе отсутствует.

Адекватность подходов к изучению репродуктивного поведения рыб является отдельной про-

блемой [19, 20]. Одно из наиболее говорящих названий дали своей статье Катарина Поука и Килам Браун — «Рыбы, как задавать им правильные вопросы?» [21]. С нашим исследованием связаны две важные методические проблемы. Во-первых, почти во всех работах описан искусственный нерест анабаса, стимулированный с помощью гормональных препаратов. Однако известно, что репродуктивное поведение искусственно стимулированных рыб и рыб, отнерестившихся естественным образом, может существенно различаться. Например, в нормальных условиях размножения оба родителя полосатого змееголова *Channa striata* проявляют родительскую заботу [22], но после искусственного нереста самка может не участвовать в заботе о потомстве [23] либо родительское поведение исчезает у обоих партнеров [24]. Для размножения анабаса в аквариуме без использования гормональных инъекций действительно необходимы время на подготовку и достаточная квалификация исследователя. Тем не менее даже опытным аквариумистам любителям данная задача не представляется невыполнимой, и в аквариумной литературе естественный нерест этих рыб неоднократно описан [25, 26].

Вторая проблема связана с методом изучения выбора партнера по размножению, поскольку дизайн эксперимента и интерпретация результатов во многом определяют выводы [27, 28]. Прежде всего, важно отличать предпочтения от конечного выбора [1, 28]. В тесте рыба может демонстрировать предпочтения по отношению к потенциальному партнеру, но в итоге размножиться с другим индивидуумом [29]. Это происходит в том числе из-за того, что окончательный выбор часто складывается в несколько этапов [30] и определяется комплексом предпочтений, лишь некоторые из которых выявляются тестами. Кроме того, на выбор влияют взаимность, внутривидовая конкуренция и совокупность внешних факторов, что тоже часто не учитывается тестами [31].

В связи с этим мы отказались от использования в своей работе Y-образных лабиринтов и аналогичных экспериментальных установок, в которых фактически исследуется не выбор, а лишь предпочтение [32, 33]. Еще одним аргументом против такого тестирования были результаты нашей работы, в которой мы показали, что одиночное содержание искажает поведение анабасов, ведущих в природе групповой образ жизни [34]. По тем же причинам мы отказались от дизайна эксперимента, предполагающего безальтернативные предъявления потенциального партнера [27].

Альтернативная методика предполагает наблюдение за группой животных, из которых естественным образом формируются пары. Выбор считается состоявшимся, если пара размножилась. При этом возникает очевидная необходимость различать наблюдаемых особей между со-

бой. Наиболее простым способом обеспечения таких различий является мечение. Однако у мечения есть свои недостатки, главный из которых заключается в том, что сама эта процедура, равно как и последующее существование с метками, может влиять на поведение рыб, особенно небольших [19, 35]. Современные методы мечения позволяют лишь частично решить эту проблему [36]. Выбранный нами подход к индивидуальной идентификации особей описан в разделе «Материалы и методы».

Целью данной работы были анализ роли размера тела в выборе партнера по размножению у рыбы-ползуна во время естественного нереста, а также исследование роли субординантного самца и краткое сравнение естественного нереста с искусственно индуцированным.

### Материалы и методы

**Основные условия наблюдений.** Наблюдения выполнены на базе Приморского отделения Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (Вьетнам, г. Нячанг). Использовали аквариумы полезным объемом 200 л (109 × 58 × 35 см). Все аквариумы содержали укрытия, представляющие собой согнутые в виде двускатной крыши куски пластика около 20 см в длину. Днем аквариумы освещались рассеянным естественным светом, ночью использовали искусственное освещение, минимально достаточное для визуальных наблюдений. Температура воды большую часть времени поддерживалась на уровне 26–31°C, однако для стимуляции нереста периодически опускалась до 22–24°C (см. ниже).

**Животные.** Использованные в работе ползуны относятся к популяциям рек Кай и Зинь (Вьетнам, провинция Кханьхоа). Рыб ловили сетями, после чего осуществляли карантин, акклимацию и подготовку к нересту. В общей сложности исследовано поведение ползунов в 17 нерестовых группах, каждая из которых состояла из одной самки и двух самцов. Измерение стандартной длины тела рыб (Standard length, SL, мм) проводили после окончания нереста. Поскольку икра анабаса обладает положительной плавучестью и всплывает на поверхность [37], для подсчета общего количества выметанной икры достаточно было подсчитать ее количество на единицу площади (25 см<sup>2</sup>) поверхности аквариума в нескольких местах и соотнести с общей площадью.

**Подготовка к нересту.** Подготовку к нересту осуществляли обычными аквариумными методами, подробно описанными в литературе [38, 39]. Основная идея заключается в имитации изменений среды, происходящих в период нереста. Технически процедура заключалась в манипуляции параметрами содержания рыб, включая режим кормления и состав корма, режим подмены воды,

уровень, температуру, скорость течения и пр. Для этих целей использовали стандартное аквариумное оборудование и технику, сухие и живые корма. Точное описание универсального протокола невозможно, поскольку фактически процедура сводилась к перебору потенциально значимых факторов, любой из которых мог оказаться решающим. Как правило, после 3–4 нед. акклимации при 26–31°C без подмены воды, без аэрации и фильтрации производили замену сразу 50% объема, временно снижали температуру до 22–24°C и включали насосы, обеспечивающие аэрацию и течение воды. Начиная с этого же дня, рыб переводили на интенсивное кормление живыми кормами взамен сухих. В некоторых случаях этих действий оказывалось достаточно для начала нереста. В других приходилось еще несколько раз манипулировать различными параметрами.

**Формирование нерестовых групп и идентификация особей.** Первоначально в аквариум сажали группу из 16–20 ползунов. Поскольку половой диморфизм у этих рыб выражен слабо, соотношение полов было произвольным. После описанной выше подготовки начинались характерные межполовые взаимодействия (ухаживания). Основные особенности нерестового поведения самок и самцов ползунов известны, что позволяет надежно различать их как перед нерестом, так и во время него. Иначе говоря, репродуктивное поведение анабаса само по себе является гендерным признаком, и в этот период уже не составляло труда выбрать самку и двух взаимодействующих с ней самцов. Отобранную группу отсаживали из общего в такой же нерестовый аквариум, либо оставляли, а отсаживали всех остальных рыб. Первоначально предполагалось метить рыб, несмотря на упомянутые недостатки этого метода. Однако как собственные [17], так и литературные [16, 18] данные показали, что в этом нет необходимости, а все члены нерестовой группы легко визуализируются (см. результаты).

**Статистическая обработка.** Нормальность распределения данных проверяли критерием Шапиро-Уилка  $W$ . Поскольку в ряде случаев нормальность была нарушена, а объем выборки сравнительно невелик, были использованы методы непараметрической статистики:  $U$ -критерий Манна – Уитни и коэффициент ранговой корреляции  $R_s$  Спирмена.

**Этическое замечание.** Работы проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных [40] и Руководством по обращению с животными в поведенческих исследованиях и обучении [41]. Размер выборки был минимизирован в соответствии с современными международными этическими требованиями, предъявляемыми к исследованиям на рыбах [42]. Этими же требованиями мы руководствовались при подборе минимально инвазивных методов работы.

## Результаты

Размер тела самок составил 65–142 мм (среднее значение  $M = 95$  мм), самцов – 68–124 мм ( $M = 83$  мм). Половой дихроматизм у анабаса не отмечен. Другие формы диморфизма также выражены слабо. В частности, в нашей выборке не было выявлено значимых межполовых различий по размеру тела ( $U = 197$ ;  $p = 0,067$ ).

Акклимация и подготовка к нересту в общем аквариуме занимала 4–7 нед. После изоляции группы в нерестовом аквариуме нерест происходил еще через 1–4 сут. Нерест предвляли длительные (2–5 ч) ухаживания, начинавшиеся вечером, с 20:00 и позже. Сам нерест происходил после 22:00 (в 15 группах из 17 – после полуночи), продолжался 2–4 ч и заканчивался в 2:00–6:00. Во всех группах оба самца пытались ухаживать за самкой, однако ее ответное преднерестовое поведение всегда адресовалось только одному из них (далее самец 1). Другой самец (далее самец 2) в каждой группе отвергался самкой, агрессивно отгонялся ей и не участвовал в первых икрометаниях. Агонистические и конкурентные взаимодействия между самцами, первоначально выраженные, быстро затухали. После изгнания самец 2 обычно занимал одно из укрытий в стороне от места нереста и проводил там большую часть времени.

Продолжительность каждого спаривания составляла 5–10 с, перерывы между последовательными спариваниями – от 2 до 20 мин. В перерывах партнеры отдыхали. За ночь каждая самка отнерестилась от 10 до 22 раз, выметав 2–8 тыс. икринок. Повторные икрометания (начиная со 2-го) происходили уже без длительного ухаживания. В течение ночи как нерестовая, так и в целом двигательная активность самцов 1 снижалась, а перерывы между икрометаниями возрастали, так что ближе к утру они начинали избегать самок и прятаться в укрытия, как и самцы 2. Активность самок сохранялась дольше, в результате чего инициатива в ухаживаниях постепенно переходила к ним. Не получая ответной реакции от самцов 1, некоторые из самок переключали свое внимание на первоначально отвергнутых ими самцов 2. Благодаря этому в 6 из 17 групп самцы 2 приняли участие в нересте и, соответственно, 6 из 17 самок (35%) отнерестились с обоими самцами (1–3 спаривания из 16–22, 5–15%). Некоторые из самцов 2 могли также спариваться во второй половине ночи в периоды отдыха самцов 1.

Никаких значимых различий по размеру тела между нерестящимися и отвергнутыми самцами (самец 1 vs. Самец 2) не обнаружено ( $U = 93$ ;  $p = 0,079$ ). Предпочтения самками более крупных самцов также не выявлено. В 41% случаев самец 1 был мельче, чем самец 2. В 59% случаев самец 1 был также мельче, чем самка. Корреляции по размерам тела между самками и самцами 2 также не

наблюдалось ( $R_p = 0,04$ ;  $p = 0,885$ ; рисунок). При этом, однако, была обнаружена положительная корреляция между размерами тела самки и самца 1 (рисунок), что свидетельствует о наличии размерной ассортативности спаривания во время первых икрометаний ( $R_p = 0,70$ ;  $p = 0,002$ ).

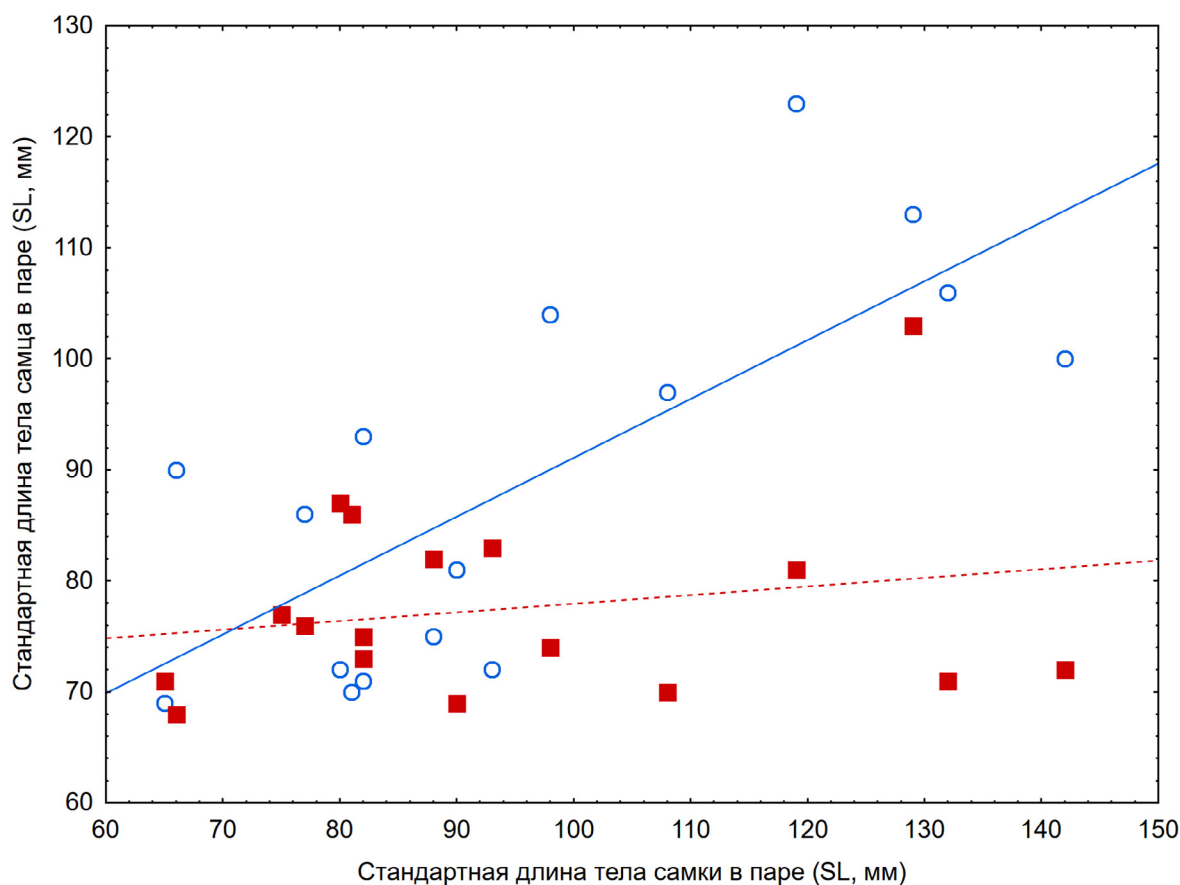
Таким образом, в нашей работе была выявлена положительная размерная ассортативность при первоначальном выборе партнера по размножению самкой анабаса, а также показано, что брачная система этих рыб характеризуется пластичностью, характер которой обсуждается ниже.

### Обсуждение

Длительное ухаживание и парный нерест позволяли предполагать, что образование пар у анабаса происходит неслучайным образом. В данной работе мы показали, что, действительно, для этих рыб характерна положительная размерная ассортативность спаривания. Заметим, что ассортативность не препятствует многократности спаривания. Сходная ситуация характерна, например, для гуппи *Poecilia reticulata* [43]. Было также показано, что нерест анабасов может быть как моногамным, так и (реже) полиандрическим. Ранее нами у этих же рыб была обнаружена полигиния [17]. Соответственно, систему спаривания ползунов можно

считать пластичной, предположительно варьирующей от моногамии до разных форм полигамии. Очевидно, что про моногамию в данном случае речь идет условно, как про устойчивую сексуальную связь, сохраняющуюся на протяжении одного нереста, который состоит из серии спариваний. Маловероятно, что пара сохраняется на протяжении всего сезона размножения и тем более дольше. С другой стороны, в некоторых случаях анабас нерестится лишь единожды за сезон и тогда можно говорить про моногамию уже безо всяких оговорок. Родительская забота также неизвестна у этих рыб [46], что в целом нетипично для моногамных видов [11]. Для выяснения того, какая из систем спаривания наиболее типична для ползуна, а также для выявления факторов влияния на нее необходимы исследования, в которых будет изучено размножение в больших группах и на протяжении хотя бы одного сезона.

Из приведенного выше описания нереста и нерестового поведения очевидно, что необходимости мечения рыб в наших условиях не было. Самка всегда отличалась от самца по поведению, а один из самцов почти все время был малоподвижен и находился в стороне от нерестящейся пары, на расстоянии в несколько десятков сантиметров. Непрерывное наблюдение за рыбами на протя-



**Рисунок.** Соотношение стандартных длин тела (Standard Length — SL, мм) самок (ось абсцисс) и самцов (ось ординат) в парах.  $\circ$  — самец 1,  $\blacksquare$  — самец 2.

жении всего нереста позволяло точно идентифицировать особей. Тем не менее, проблема индивидуального распознавания будет актуальна в ситуации, когда на нерест будет посажено большее количество рыб.

Подчеркнем, что именно использованный дизайн исследования позволил выявить у анабаса полиандрию. Если бы было применено обычное тестирование, мы не обнаружили бы, что самки могут менять партнеров, несмотря на первоначальные предпочтения. Со сходной ситуацией мы столкнулись при изучении африканских усачей *Labeobarbus* spp. Несмотря на выявленную нами в тесте избирательность потенциальных партнеров, то есть предпочтения [33], нерест этих рыб в природе может быть промискуитетным — очевидно, без какого бы то ни было выбора партнеров [44].

Естественный нерест ползунов имеет некоторые отличия от размножения этих рыб под воздействием гормональных препаратов, известного как по литературным [16, 18], так и по нашим данным [17]. Если индуцированный нерест может произойти в любое время суток, то естественное размножение приурочено к ночному периоду. Под воздействием гормональной стимуляции период ухаживания (а, следовательно, и время отбора партнера) укорачивается. Искусственный нерест происходит энергичнее, перерывы между спариваниями сокращаются. Стимулированный самец ведет себя более активно по отношению к самке и более агрессивно по отношению к субординантному самцу. Партнеры дольше сохраняют сексуальную активность, в результате чего число спариваний и порций икры, а также общее количество отложенной икры возрастают.

При индуцированном нересте также увеличивается асинхронность затухания репродуктивной активности, самки дольше сохраняют готов-

ность к нересту. По всей видимости, это обстоятельство является важным фактором, способствующим нересту первоначально отвергнутых самцов. В нашей работе лишь 35% самок отнерестились в конечном итоге не только с выбранным, но и с исходно отвергнутым самцом. При индуцированном нересте второстепенный самец практически всегда получает возможность принять участие в размножении. Таким образом, гормональная стимуляция не только меняет паттерн репродуктивного поведения анабаса, но и снижает эффект ассортативности спаривания.

Гормоны — один из основных механизмов регуляции поведения [45], в связи с чем не удивительно, что искусственная гормональная стимуляция нереста существенно влияет на репродуктивное поведение. Ранее мы уже отмечали, что некорректные подходы к изучению поведения анабаса могут приводить к появлению артефактов [34, 46]. Как представляется, гормональная стимуляция нереста относится к этой же категории методов, перспективных для рыбоводства, но неприемлемых в поведенческих исследованиях.

Работа выполнена в рамках программы Эколан Э-3.2, раздел «Размножение, репродуктивное и пищевое поведение лабиринтовых рыб (Anabantoidei)» Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра. Автор благодарит Динь Тхи Хай Йен и Во Тхи Ха (Приморское отделение Тропического центра) за многолетнее сотрудничество в исследованиях анабаса. Исследования проводили с соблюдением международных этических норм работы с животными [40–42] (подробнее см. раздел «Материалы и методы»). Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edward D.A. The description of mate choice // *Behav. Ecol.* 2015. Vol. 26. N 2. P. 301–310.
2. Burley N. The meaning of assortative mating // *Ethol. Sociobiol.* 1983. Vol. 4. N 4. P. 191–203.
3. Jiang Y., Bolnick D.I., Kirkpatrick M. Assortative mating in animals // *Am. Nat.* 2013. Vol. 181. N 6. P. E125–E138.
4. Andersson M., Simmons L.W. Sexual selection and mate choice // *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 21. N 6. P. 296–302.
5. Shuker D.M., Kvarnemo C. The definition of sexual selection // *Behav. Ecol.* 2021. Vol. 32. N 5. P. 781–794.
6. Lindsay W.R., Andersson S., Bererhi B., et al. Endless forms of sexual selection // *PeerJ.* 2019. Vol. 7: e7988.
7. Janicke T., Marie-Orleach L., Aubier T.G., Perrier C., Morrow E.H. Assortative mating in animals and its role for speciation // *Am. Nat.* 2019. Vol. 194. N 6. P. 865–875.
8. Class B., Dingemanse N.J. A variance partitioning perspective of assortative mating: proximate mechanisms and evolutionary implications // *J. Evol. Biol.* 2022. Vol. 35. N 4. P. 483–490.
9. Andersson M. 1994. Sexual selection. Princeton: Princeton Univ. Press, 600 pp.
10. López-Cortegano E., Carpena-Catoira C., Carvajal-Rodríguez A., Rolán-Alvarez E. Mate choice based on body size similarity in sexually dimorphic populations causes strong sexual selection // *Anim. Behav.* 2020. Vol. 160. P. 69–78.
11. Wootton R.J., Smith C. 2015. Reproductive biology of teleost fishes. Chichester: Wiley-Blackwell, 496 pp.
12. Borghezan E. de A., Pinto K. da S., Zuanon J., Pires T.H. da S. Someone like me: Size-assortative pairing and mating in an Amazonian fish, sailfin tetra *Crenuchus spilurus* // *PLOS ONE.* 2019. Vol. 14. N 9: e0222880.

13. Rueger T., Gardiner N.M., Jones G.P. Size matters: male and female mate choice leads to size-assortative pairing in a coral reef cardinalfish // *Behav. Ecol.* 2016. Vol. 27. N 6: arw082.
14. Auld H.L., Noakes D.L.G., Banks M.A. Advancing mate choice studies in salmonids // *Rev. Fish Biol. Fisher.* 2019. Vol. 29. N 2. P. 249–276.
15. Mookerjee H.K., Mazumdar S.R. On the life history, breeding and rearing of *Anabas testudineus* Bloch // *J. Dep. Sci. Calcut. Univ.* 1946. Vol. 2. P. 101–140.
16. Banerji S.R., Thakur N.K. Observations on the spawning behavior of *Anabas testudineus* (Bloch) // *Indian J. Anim. Sci.* 1981. Vol. 51. N 6. P. 651–654.
17. Zworykin D.D. Reproduction and spawning behavior of the climbing perch *Anabas testudineus* (Perciformes, Anabantidae) in an aquarium // *J. Ichthyol.* 2012. Vol. 52. N 6. P. 379–388.
18. Behera S., Ahmed A.S., Kumar S., Gogoi R., Jomang O., Baksi S. Courtship behaviour and breeding success of climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch) in three different breeding sets with the application of a synthetic hormone (WOVA-FH) // *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2016. Vol. 6. N 1. P. 1–6.
19. Bégout M. L., Kadri S., Huntingford F., Damsgård B. Tools for studying the behaviour of farmed fish // *Aquaculture and Behavior* / Eds. F. Huntingford, M. Jobling, and S. Kadri. Oxford: Wiley, 2012. P. 65–86.
20. Utne-Palm A.C., Smith A. Fish as laboratory animals // *The Welfare of Fish* / Eds. T. Kristiansen, A. Fernö, M. Pavlidis, and H. van de Vis. Cham: Springer, 2020. P. 375–400.
21. Pouca C.V., Brown C. Fish – how to ask them the right questions // *Field and laboratory methods in animal cognition: A comparative guide* / Eds. N. Bueno-Guerra and F. Amici. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2018. P. 199–221.
22. Paray B.A., Haniffa M.A., Manikandaraja D., Milton M.J. Breeding behavior and parental care of the induced bred striped murrel *Channa striatus* under captive conditions // *Turkish J. Fisher. Aquat. Sci.* 2013. Vol. 13. N 4. P. 707–711.
23. Marimuthu K., Haniffa M.A., Jesu Arockia Raj A., Muruganandam M. Spawning and parental behaviour in the induced bred murels // *Indian J. Fisher.* 2001. Vol. 48. N 4. P. 409–411.
24. Parameswaran S., Murugesan V.K. Observations on the hypophysation of murels (Ophicephalidae) // *Hydrobiologia.* 1976. Vol. 50. N 1. P. 81–87.
25. Гуржуй А. Нерестятся анабасы. Азиатский вездеход // *Аквариум.* 2010. № 5. С. 6–12.
26. Denaro M. Climbing gouramis (*Anabas* spp.) // *TFH Magazine.* 2012. N 6. P. 34–36.
27. Dougherty L.R., Shuker D.M. The effect of experimental design on the measurement of mate choice: a meta-analysis // *Behav. Ecol.* 2015. Vol. 26. N 2. P. 311–319.
28. Dougherty L.R. Designing mate choice experiments // *Biol. Rev.* 2020. Vol. 95. N 3. P. 759–781.
29. Taborsky B., Guyer L., Taborsky M. Size-assortative mating in the absence of mate choice // *Anim. Behav.* 2009. Vol. 77. N 2. P. 439–448.
30. Budaev S.V., Zworykin D.D., Mochek A.D. Individual differences in parental care and behaviour profile in the convict cichlid: a correlation study // *Anim. Behav.* 1999. Vol. 58. N 1. P. 195–202.
31. Candolin U. Mate choice in a changing world // *Biol. Rev.* 2019. Vol. 94. N 4. P. 1246–1260.
32. Doutrelant C., McGregor P. Eavesdropping and mate choice in female fighting fish // *Behaviour.* 2000. Vol. 137. N 12. P. 1655–1668.
33. Zworykin D.D., Budaev S.V., Darkov A.A., Dzerzhinskii K.F., Lyovin B.A., Mina M.V. Assessment of the role of chemoreception in the mate choice in barbs of the *Barbus intermedius* complex from Lake Tana, Ethiopia // *J. Ichthyol.* 2006. Vol. 46. N 8. P. 661–667.
34. Zworykin D.D. The behavior of climbing perch, *Anabas testudineus*, with novel food in individual and social conditions // *J. Ichthyol.* 2018. Vol. 58. N 2. P. 260–264.
35. Ruberto T., Clément R.J.G., Spinello C., Neri D., Macri S., Porfiri M. The tagging procedure of visible implant elastomers influences zebrafish individual and social behavior // *Zebrafish.* 2018. Vol. 15. N 5. P. 433–444.
36. Delcourt J., Ovidio M., Denoël M., Muller M., Pendeville H., Deneubourg J.-L., Poncin P. Individual identification and marking techniques for zebrafish // *Rev. Fish Biol. Fisher.* 2018. Vol. 28. N 4. P. 839–864.
37. Dzerzhinskiy K.F., Zworykin D.D., Budaev S.V. Early ontogeny of the climbing perch *Anabas testudineus* (Anabantidae) in relation to the buoyancy dynamics // *J. Ichthyol.* 2019. Vol. 59. N 5. P. 766–775.
38. Emmens C.W. Keeping and breeding aquarium fishes. N.Y.: Academic Press, 1953. 202 pp.
39. Кочетов С.М. Разведение аквариумных рыб. Москва: Вече, 2007. 208 с.
40. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th edition. Washington, DC: The National Acad. Press, 2011. 246 pp.
41. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching // *Anim. Behav.* 2022. Vol. 183. N 1. P. I–XI.
42. Sloman K.A., Bouyoucos I.A., Brooks E.J., Sneddon L.U. Ethical considerations in fish research // *J. Fish Biol.* 2019. Vol. 94. N 4. P. 556–577.
43. Magurran A.E. Evolutionary ecology: The Trinidadian guppy. Oxford: Oxford Univ. Press, 2005. 206 pp.
44. Dzerzhinskii K.F., Shkil F.N., Abdissa B., Zelalem W., Mina M.V. Spawning of large *Barbus* (*Barbus intermedius* complex) in a small river of the Lake Tana basin (Ethiopia) and relationships of some putative species // *J. Ichthyol.* 2007. Vol. 47. N 8. P. 639–646.
45. Russart K.L.G., Nelson R.J. Hormones and behavior: basic concepts // *Encyclopedia of animal behavior.* Second edition. Vol. 1 / Ed. J.C. Choe. London: Academic Press, 2019. P. 51–60.
46. Zworykin D.D. Parental care in the climbing perch (*Anabas testudineus*): confusion or lost data? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 4. P. 237–241.

Поступила в редакцию 19.07.2022

После доработки 19.09.2022

Принята в печать 23.10.2022

## RESEARCH ARTICLE

# Mate choice and size-assortative mating in the climbing perch *Anabas testudineus* (Actinopteri: Anabantidae)

D.D. Zworykin 

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

Non-random mating plays a key role in speciation and impacts the individual life history. Body size is one of the most important traits by which the mate choice is carried out. Various patterns of body size preference are known in fish, but this component of reproductive strategy has been studied in a limited number of species. Although the climbing perch (*Anabas testudineus*) is widespread and well-known, few descriptions of its spawning have been published, only in captivity and in most cases artificially induced with hormonal agents. This paper describes the main features of natural spawning of the climbing perch in aquarium compared to induced spawning. A positive size-assortative mating has been revealed. The mating system of these fish has been shown to be flexible, presumably ranging from monogamy to polygamy. The results are discussed in the context of the general issue of the adequacy of fish behaviour research methods.

**Keywords:** *climbing perch, Anabas testudineus, mate choice, assortative mating, body size preferences, natural spawning*

**Funding:** The research was performed under the framework of the “Ecolan E-3.2” programme of the Vietnam-Russian Tropical Research and Technological Centre.

## Сведения об авторе

Зворыкин Дмитрий Дмитриевич — канд. биол. наук., ст. науч. сотр. лаборатории поведения низших позвоночных Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН). Тел.: 8-495-952-40-17, e-mail: d.zworykin@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6198-3299>

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.1+612.337

**Механизмы холинергического сокращения гладкой мускулатуры кишечника беломорской трески *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae): вклад различных подтипов М-холинорецепторов и Rho-киназы****А.А. Швецова<sup>1,\*</sup> , Г.В. Моргунова<sup>2</sup> , Е.А. Новодережкина<sup>1</sup> , В.М. Потехина<sup>1</sup> ,  
А.А. Каменский<sup>1</sup> , О.С. Тарасова<sup>1</sup> **

<sup>1</sup>Кафедра физиологии человека и животных и <sup>2</sup>сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\*e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

Изучение особенностей функционирования различных систем организма у разных позвоночных животных является одной из ключевых задач сравнительной физиологии. Костистые рыбы — многочисленная группа позвоночных, однако механизмы функционирования их пищеварительного тракта недостаточно изучены и в основном только для такого модельного объекта как *Danio rerio*. Целью данной работы было охарактеризовать участие различных подтипов М-холинорецепторов и фермента Rho-киназы в холинергическом сокращении гладкой мускулатуры кишечника беломорской трески *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae). Из проксимального отдела кишки вырезали продольную полоску и помещали ее в установку для регистрации сократительных ответов в изометрическом режиме. Сократительные реакции в ответ на ацетилхолин полностью блокировались атропином. Блокада М<sub>3</sub>-холинорецепторов с помощью 4-DAMP приводила к ослаблению вызванного ацетилхолином сокращения по сравнению с ответом в контроле. При блокаде М<sub>1</sub>-рецепторов с помощью пирензепина сократительные ответы также уменьшались, но менее выражено, чем при блокаде М<sub>3</sub>-холинорецепторов. Блокада М<sub>2</sub>-холинорецепторов с помощью метоктрамина не влияла на величину сократительного ответа. Инкубация препаратов с ингибитором Rho-киназы сопровождалась существенным уменьшением сократительных реакций по сравнению с контролем, а также более быстрым снижением силы сокращения после достижения «пика» реакции. Таким образом, ацетилхолин вызывает сокращение гладкой мускулатуры кишечника трески путем активации М<sub>3</sub> и М<sub>1</sub>, но не М<sub>2</sub>-холинорецепторов. Активность фермента Rho-киназы способствует развитию и поддержанию сокращения гладкой мускулатуры кишечника трески под действием ацетилхолина. Полученные результаты представляют интерес для сравнительной физиологии, они могут оказаться важными для понимания механизмов повреждающего влияния факторов окружающей среды на организм костистых рыб, а также при использовании рыб в доклинических исследованиях лекарственных препаратов.

**Ключевые слова:** *Gadus morhua marisalbi*, гладкая мышца, кишечник, ацетилхолин, мускариновые холинорецепторы, Rho-киназа

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-231-240

Одной из важнейших задач сравнительной и эволюционной физиологии является всестороннее изучение особенностей функционирования различных систем органов у разных позвоночных животных. Костистые рыбы арктических морей составляют большую долю морского биоразнообразия России. Тем не менее, многие аспекты физиологии рыб, которые населяют акваторию Арктики, в частности, атлантической трески (*Gadus morhua*), изучены мало. Изменяющиеся климатические условия и загрязнение окружающей среды могут отрицательно влиять на организм рыб, в том числе и на функционирование их желудочно-кишечного тракта [1, 2]. Эти обстоятельства, а также все большая популярность использования костистых рыб в качестве объектов доклинических ис-

следований лекарственных препаратов [3] определяют необходимость всестороннего изучения их физиологических особенностей.

Перемещение и расщепление компонентов пищи в кишечнике невозможно без координированных эпизодов сокращения и расслабления его гладкомышечной стенки. Как и у других позвоночных животных, гладкая мускулатура кишечника костистых рыб формирует два слоя — наружный продольный и внутренний кольцевой. Моторика кишечника позвоночных животных находится под контролем энтеральной нервной системы, которая представлена двумя нервными сплетениями — подслизистым (Мейсснеровым) и межмышечным (Ауэрбаховым) — и включает чувствительные, вставочные и моторные нейроны

множественной медиаторной специализации [4, 5]. Среди них весьма многочисленны моторные холинергические нейроны, которые образуют синапсы с различными типами клеток стенки кишечника, в том числе с гладкомышечными.

Известно, что ацетилхолин стимулирует моторику кишечника, в том числе у костистых рыб [4–6]. У млекопитающих ключевую роль в холинергическом сокращении гладкомышечных клеток кишечника играют мускариновые рецепторы второго и третьего подтипов [7–12]. В некоторых исследованиях также продемонстрирован функциональный вклад  $M_1$ -холинорецепторов в регуляцию сократительной активности гладкой мышцы кишечника [13–15]. Какие подтипы М-холинорецепторов опосредуют вызванное ацетилхолином сокращение гладкой мускулатуры кишечника рыб, до сих пор остается неизвестным.

Сокращение гладкомышечных клеток запускается повышением внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  [16]. Вместе с тем гладкая мышца способна поддерживать тоническое сокращение даже после того, как уровень  $Ca^{2+}$  в клетке значительно снизился, этот феномен получил название «повышение чувствительности сократительного аппарата к кальцию» [17]. Фермент Rho-киназа играет ключевую роль в осуществлении тонического сокращения гладкой мышцы: она фосфорилирует и ингибирует фосфатазу легких цепей миозина (ЛЦМ), что обеспечивает высокий уровень фосфорилирования ЛЦМ даже при низкой активности  $Ca^{2+}$ -зависимой киназы ЛЦМ [17]. Участие Rho-киназы в регуляции холинергического сокращения гладких мышц пищеварительного тракта показано для амфибий [18] и многих млекопитающих [19–23], однако ее роль в кишечнике рыб пока не изучена.

Таким образом, целью данной работы было охарактеризовать участие различных подтипов М-холинорецепторов и фермента Rho-киназы в холинергическом сокращении гладкой мускулатуры кишечника одного из подвидов атлантической трески – беломорской трески *G. morhua marisalbi*.

### Материалы и методы

**Объект исследования.** Исследование проводили на Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (ББС МГУ). Объектом исследования служили особи беломорской трески *G. morhua marisalbi* (Gadidae) обоих полов с длиной тела не менее 20 и не более 30 см (приблизительный возраст – от 2 до 3 лет) [24]. Выловленных из моря рыб содержали в аквариумах с постоянно обновляющейся морской водой. Исследования проводили в соответствии с требованиями, сформулированными в Директиве Совета Европейского сообщества 2010/63/EU по охране животных, ис-

пользуемых в научных целях. Всего в работе было использовано 37 животных.

**Приготовление препарата.** Из тела рыбы выделяли проксимальные петли кишечника, осторожно удаляя брыжейку с расположенными в ней кровеносными сосудами. Полученный сегмент кишки разрезали вдоль, фиксировали булавками ко дну препаровальной ванночки внутренней стороной вверх и заливали рабочим раствором следующего состава: NaCl – 150,1 мМ, KCl – 5,2 мМ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1,8 мМ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  – 1,9 мМ,  $NaHCO_3$  – 7 мМ,  $CaCl_2$  – 1,9 мМ, D-глюкоза – 5,6 мМ (pH от 7,8 до 7,9); этот же раствор использовали в течение последующего эксперимента. Из стенки кишечника вырезали отчетливо видимую продольную полоску (складку) шириной 1–1,5 мм и длиной 10–12 мм. К обоим концам полоски привязывали лигатуры и переносили препарат в экспериментальную установку.

**Регистрация сократительных реакций продольной полоски кишечника в изометрическом режиме.** Препарат располагали вертикально в камере объемом 10 мл, дистальную лигатуру крепили ко дну экспериментальной камеры, а проксимальную – к рычажку тензометрического датчика. Перед началом работы экспериментальную камеру и подводящие к ней раствор трубки заполняли рабочим раствором (состав см. выше). Во время эксперимента с помощью перистальтического насоса через камеру с препаратом непрерывно создавали проток раствора со скоростью 7 мл/мин. Температуру раствора в камере поддерживали на уровне 10°C. Для оксигенации раствор предварительно аэрировали карбогеном (5%  $CO_2$  + 95%  $O_2$ ), затем измеряли и при необходимости корректировали pH с использованием NaOH. Показания тензометрического датчика оцифровывали с частотой 10 Гц с помощью аналого-цифрового преобразователя E14-140M (L-CARD, Россия) и записывали на жесткий диск персонального компьютера с использованием программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия).

Препарат осторожно растягивали до значения силы 5 мН и оставляли на 20–30 мин для расслабления гладкой мышцы, в течение этого времени периодически увеличивали растяжение препарата, возвращая уровень преднагрузки к 5 мН. Затем проводили однократную активацию препарата ацетилхолином (10 мкМ, 5 мин), отмывали раствором без ацетилхолина (10 мин) и еще раз корректировали значение силы к 5 мН. Спустя 5 мин приступали к проведению эксперимента по одному из описанных ниже протоколов.

Первый протокол использовали с целью оценить диапазон эффективных концентраций ацетилхолина и выбрать концентрацию агониста для дальнейшего фармакологического анализа. Для этого регистрировали сократительные ответы препарата на ацетилхолин в концентрациях 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ. Камеру с препаратом

в течение 5 мин перфузировали рабочим раствором, содержащим ацетилхолин в одной из исследуемых концентраций, периоды отмывки между воздействиями длились 10 мин.

Второй протокол использовали с целью оценки вклада разных подтипов М-холинорецепторов и Rho-киназы в холинергическое сокращение гладкой мышцы кишечника трески. Для этого регистрировали две реакции на ацетилхолин: в отсутствие и в присутствии блокаторов/ингибиторов. Камеру с препаратом последовательно перфузировали: (1) раствором ацетилхолина (10 мкМ, 5 мин); (2) раствором без фармакологических веществ (отмывка, 5 мин); (3) раствором с добавлением исследуемого блокатора/ингибитора (5 мин); (4) раствором блокатора/ингибитора с добавлением ацетилхолина (10 мкМ, 5 мин); (5) раствором блокатора/ингибитора без ацетилхолина (5 мин); (6) раствором без фармакологических веществ (5 мин). Все растворы готовили на основе рабочего раствора. Параллельно проводили контрольные эксперименты, в которых регистрировали две реакции на ацетилхолин (10 мкМ, интервал 15 мин) в отсутствие блокаторов/ингибиторов, что позволило оценить воспроизводимость реакции на ацетилхолин при повторном тестировании.

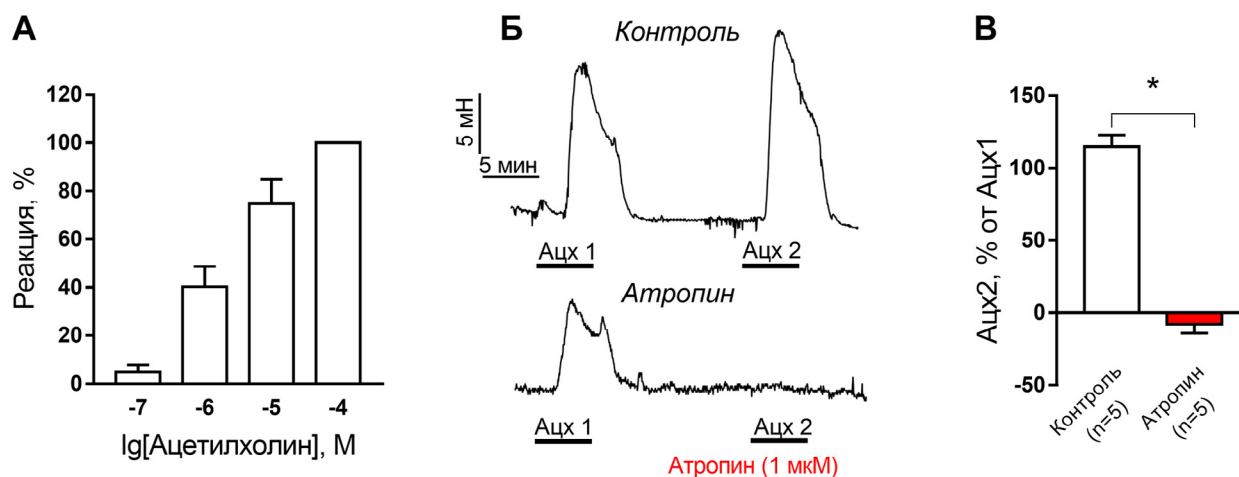
В экспериментах использовали следующие фармакологические препараты: хлорид ацетилхолина (Sigma, США), сульфат атропина (Sigma, США), йодид 4-DAMP (1,1-диметил-4-дифенилацетокси-пиперидиний; Tocris, США), дигидрохлорид пирензепина (Sigma, США), гидрат метоктрамина (Sigma, США), гидрохлорид фасудила (Tocris, США).

**Обработка и статистический анализ результатов.** Обработку полученных данных проводили с использованием программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия). Для вычисления величины реакции из значений силы при действии ацетилхолина (усреднение значений силы за 5 мин, начиная от момента ее быстрого роста) вычитали предшествующее воздействию фоновое значение силы (также усредненное за 5 мин). В первом протоколе величину сократительного ответа при действии ацетилхолина в каждой из концентраций нормировали на максимальное значение (при действии ацетилхолина в концентрации 100 мкМ). В протоколе с использованием блокаторов/ингибиторов величину второй реакции на ацетилхолин выражали в процентах от величины первой реакции, аналогичные вычисления проводили для контрольных экспериментов.

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7.0 (La Jolla, США). Нормальность распределения значений в выборках была подтверждена с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия между группами оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента и считали их статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

На первом этапе работы исследовали сократительные ответы препаратов кишечника трески на ацетилхолин в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкМ. Как видно на рис. 1А, с повышением концентрации агониста сократительные ответы препаратов кишечника трески становились более



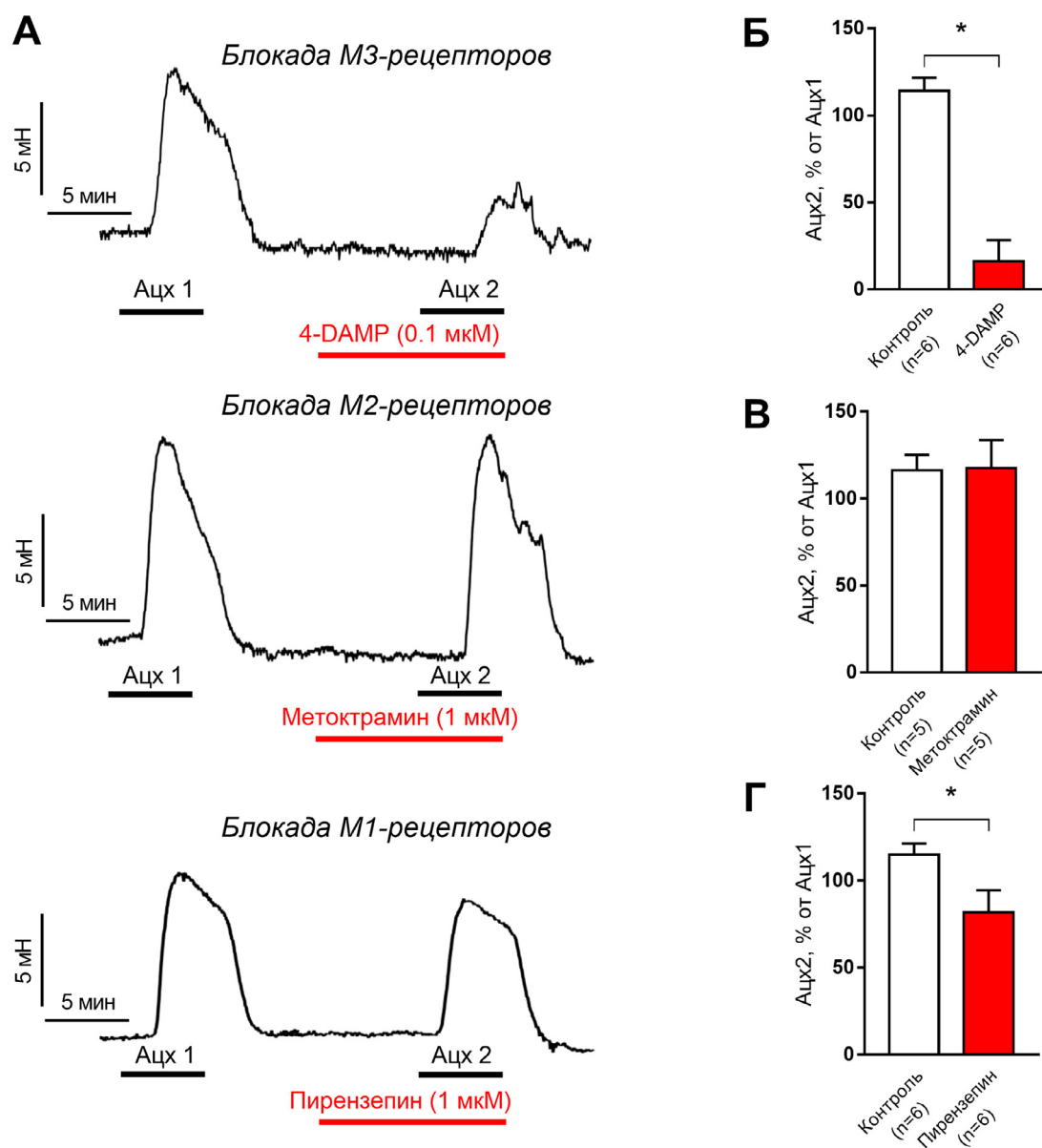
**Рис. 1.** Блокатор М-холинорецепторов атропин (1 мкМ) подавляет сокращение продольной полоски кишечника трески, вызванное ацетилхолином (10 мкМ). **А.** Зависимость «концентрация-эффект» (ацетилхолин) для продольной полоски кишечника трески ( $n = 6$ ). За 100% принята величина сократительного ответа на ацетилхолин в концентрации 100 мкМ. **Б.** Фрагмент оригинальной записи эксперимента. **Ацх1:** исходно ацетилхолин вызывает сокращение обоих препаратов гладкой мускулатуры кишечника трески («Контроль» и «Атропин»); задержка реакции соответствует времени прохождения раствора ацетилхолина по трубкам перфузионной системы (1–2 мин). **Ацх2:** повторное добавление ацетилхолина вызывает сокращение контрольного препарата («Контроль»), но не препарата, предварительно инкубированного с блокатором М-холинорецепторов атропином («Атропин»). **В.** Относительное изменение сократительных ответов продольной полоски кишечника трески на ацетилхолин при блокаде М-холинорецепторов атропином. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего;  $n$  – количество животных в группе; \* –  $p < 0,05$  (непарный критерий Стьюдента).

выраженными. В дальнейшем при изучении механизмов холинергического сокращения препаратов кишечника трески использовали ацетилхолин в концентрации 10 мкМ. В этом случае величина сократительного ответа составляла  $75 \pm 11\%$  ( $n = 6$ ) от максимального уровня, что позволяет выявить как ослабление, так и усиление холинергических реакций под действием различных блокаторов или ингибиторов. Контрольные эксперименты показали, что реакции препаратов на ацетилхолин в концентрации 10 мкМ хорошо воспроизводятся в течение эксперимента (рис. 1Б).

Следующей задачей работы было определить тип рецепторов, опосредующих сократительное

влияние ацетилхолина на гладкую мускулатуру кишечника трески. Для этого была проведена серия экспериментов с блокатором М-холинорецепторов атропином (1 мкМ). Как видно на рис. 1 (Б и В), инкубация с атропином предотвращала сокращение препаратов в ответ на ацетилхолин. Таким образом, сокращение гладкой мускулатуры кишечника трески обусловлено действием ацетилхолина преимущественно на мускариновые рецепторы.

Далее проводили эксперименты по определению подтипов М-холинорецепторов, опосредующих вызванное ацетилхолином сокращение гладкой мускулатуры кишечника трески. Блокада



**Рис. 2.** Влияние блокады различных подтипов М-холинорецепторов на сокращение продольной полоски кишечника трески, вызванное ацетилхолином (10 мкМ). А. Фрагменты оригинальных записей экспериментов. Инкубация препарата кишечника трески с блокатором М<sub>3</sub>-холинорецепторов 4-DAMP (0,1 мкМ) и блокатором М<sub>1</sub>-холинорецепторов пирензепином (1 мкМ) сопровождается снижением амплитуды холинергического сокращения, тогда как блокада М<sub>2</sub>-холинорецепторов с помощью метоктрамина (1 мкМ) не оказывает такого влияния. Б–Г. Относительное изменение сократительных ответов продольной полоски кишечника трески при блокаде М<sub>3</sub>-, М<sub>2</sub>- и М<sub>1</sub>-холинорецепторов соответственно. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n – количество животных в группе; \* –  $p < 0,05$  (непарный критерий Стьюдента).

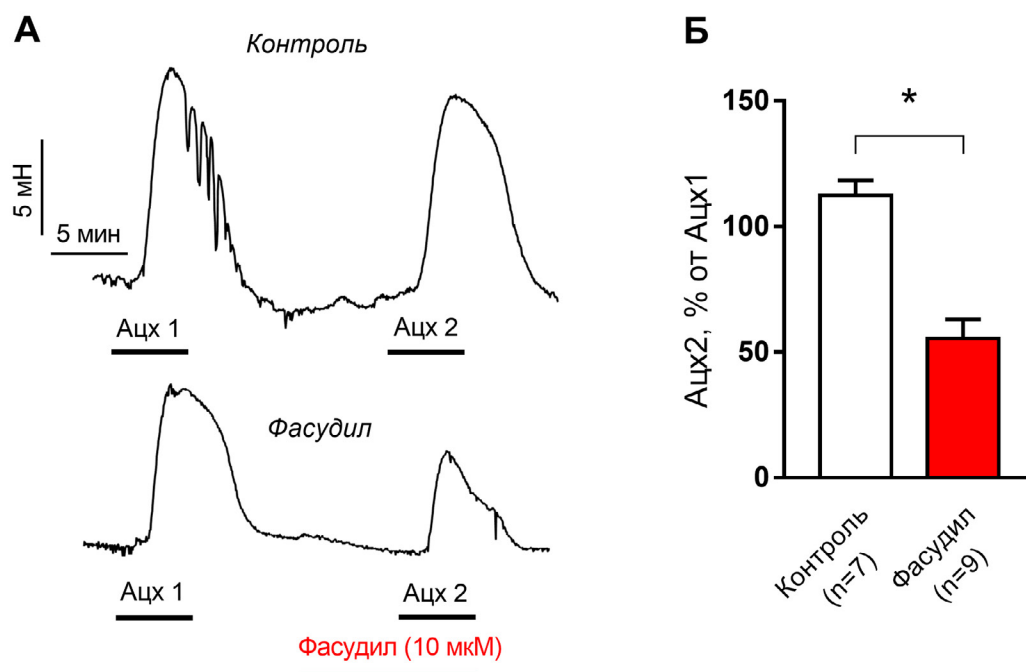
$M_3$ -холинорецепторов с помощью 4-DAMP (0,1 мкМ) привела к выраженному ослаблению вызванного ацетилхолином сокращения препаратов кишечника трески: величина сократительного ответа в присутствии 4-DAMP составила всего  $16 \pm 12\%$  относительно первой реакции на ацетилхолин (в отсутствие блокатора, рис. 2, А и Б). Блокада  $M_2$ -холинорецепторов с помощью метоктрамина (1 мкМ) не оказала такого влияния (рис. 2, А и В). Мы также показали, что блокада  $M_1$ -рецепторов с помощью пирензепина (1 мкМ) приводит к ослаблению сокращения препаратов полоски кишечника, хоть и менее выраженному, чем при блокаде  $M_3$ -холинорецепторов (рис. 2, А и Г). Таким образом, ацетилхолин вызывает сокращение гладкой мускулатуры кишечника трески путем активации  $M_3$ - и  $M_1$ -холинорецепторов, при этом вклад  $M_3$ -рецепторов более выражен.  $M_2$ -холинорецепторы, судя по всему, не являются посредниками влияния ацетилхолина на гладкую мускулатуру кишечника трески.

В последней серии экспериментов мы оценивали роль фермента Rho-киназы в регуляции холинергического сокращения продольной мускулатуры кишечника трески. Как видно из рис. 3, инкубация препаратов с ингибитором Rho-киназы фасудилом (10 мкМ) сопровождалась уменьшением сократительных реакций примерно вдвое по сравнению с реакциями препаратов в контрольных экспериментах. Помимо этого, можно наблюдать изменение формы ответа: после

достижения «пика» сокращения в присутствии фасудила происходит более резкое снижение силы, чем в контроле (рис. 3А). Полученные данные позволяют заключить, что активность фермента Rho-киназы способствует развитию и поддержанию сокращения гладкой мускулатуры кишечника трески под действием ацетилхолина.

### Обсуждение результатов

**Ацетилхолин вызывает сокращение гладкой мускулатуры кишечника беломорской трески путем активации  $M_3$ -холинорецепторов.** Холинергические парасимпатические нейроны энтеральной нервной системы, выявляемые по специфическим маркерам — холинацетилтрансферазе и везикулярному транспортеру ацетилхолина — обильно представлены в энтеральной нервной системе рыб [4, 5]. У костистых рыб подслизистое нервное сплетение развито слабо либо же вовсе отсутствует, а большая часть ацетилхолинергических нейронов сосредоточена в межмышечном нервном сплетении [5], что указывает на их роль в регуляции моторики желудочно-кишечного тракта рыб. Сократительное влияние ацетилхолина на кишечник атлантической трески было продемонстрировано еще в конце предыдущего века: в этих работах ацетилхолин вызывал увеличение перфузионного давления в кишечной трубке [6] и силы сокращения кольцевых препаратов [4]. По данным настоящего исследования, действие ацетилхолина приводит к сокращению продольного слоя гладкой мускулатуры кишечника.



**Рис. 3.** Влияние ингибитора Rho-киназы фасудила (10 мкМ) на вызванное ацетилхолином сокращение продольной полоски кишечника трески. А. Фрагмент оригинальной записи эксперимента: фасудил вызывает снижение амплитуды и длительности реакции препарата кишечника трески на ацетилхолин (Ацх2, «Фасудил») относительно контрольного препарата (Ацх1, «Контроль»). Б. Относительное изменение сократительных ответов полоски кишечника трески в присутствии ингибитора Rho-киназы фасудила (10 мкМ). Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n — количество животных в группе; \* —  $p < 0,05$  (непарный критерий Стьюдента).

Участие рецепторов мускаринового типа в холинергическом сокращении гладкой мускулатуры кишечника костистых рыб не вызывает сомнений. По данным литературы, блокада М-холинорецепторов с помощью атропина значительно уменьшала сократительные реакции гладкой мышцы кишечника радужной форели и золотой рыбки в ответ на активацию энтеральных нейронов электрическим полем [25], а также реакции гладкой мышцы кишечника сазана на экзогенный ацетилхолин [26]. Что касается атлантической трески, то Карила с коллегами продемонстрировали сравнительно небольшое снижение силы сокращения препаратов кишечника в ответ на стимуляцию электрическим полем на фоне атропина [27], тогда как по нашим же данным блокада М-холинорецепторов атропином полностью устраняет сократительную реакцию кишки на ацетилхолин. Различие результатов нашей работы и работы Карила с коллегами может быть обусловлено разными способами воздействия на клетки кишечника. Очевидно, что при электрической стимуляции возбуждаются не только холинергические нейроны, но и нейроны другой медиаторной специализации, например, секретирующие серотонин, который также вызывает сокращение гладкой мышцы кишечника трески [27]. В настоящей же работе сокращение кишечника трески было связано только с влиянием ацетилхолина. Таким образом, холинергическое сокращение гладкой мускулатуры кишечника атлантической трески опосредуют преимущественно мускариновые рецепторы.

***М<sub>3</sub>- и, возможно, М<sub>1</sub>-холинорецепторы опосредуют сокращение гладкой мышцы кишечника беломорской трески в ответ на ацетилхолин.*** Среди всех подтипов М-холинорецепторов роль первых трех (М<sub>1</sub>, М<sub>2</sub> и М<sub>3</sub>) в регуляции сократительной активности кишечника изучена наиболее подробно. В ряде исследований показаны как функциональный вклад, так и экспрессия этих подтипов мускариновых рецепторов в кишечнике [8, 9, 14, 28, 29]. Стоит отметить, что М<sub>2</sub>- и М<sub>3</sub>-рецепторы локализируются преимущественно в мембране гладкомышечных клеток [28, 30]. М<sub>1</sub>- и М<sub>3</sub>-рецепторы сопряжены с G<sub>q</sub>-белком, активация которого ведет к запуску фосфоинозитидного сигнального каскада и к увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>. М<sub>2</sub>-рецепторы сопряжены с белком G<sub>i/o</sub>, α-субъединица которого ингибирует аденилатциклазу. Важно отметить, что участие этих подтипов М-холинорецепторов в регуляции сократительной активности кишечника рыб ранее не исследовалось, большинство данных по этой проблематике было получено на млекопитающих.

В наших экспериментах блокада М<sub>3</sub>-рецепторов сопровождалась выраженным ослаблением вызванного ацетилхолином сокращения гладкой

мускулатуры кишечника беломорской трески. Схожим образом, блокаторы М<sub>3</sub>-рецепторов (4-DAMP или p-FHNSiD) вызвали значительное ослабление сократительных реакций гладкой мускулатуры кишечника морской свинки [29] и человека [9] на карбахол (аналог ацетилхолина, не гидролизующийся холинэстеразами), а также угнетали вызванное ацетилхолином сокращение кишечника кролика [31] и лошади [15]. Более того, у мышей, нокаутных по гену, кодирующему М<sub>3</sub>-рецепторы, максимальная сила сокращения продольных полосок кишечника на карбахол была существенно ниже, чем у мышей дикого типа [8]. Таким образом, М<sub>3</sub>-рецепторы играют ключевую роль в реализации холинергического сокращения кишечника у атлантической трески, как и у млекопитающих.

М<sub>2</sub>-рецепторы, по нашим данным, не участвуют в вызванном ацетилхолином сокращении кишечника трески. Следует отметить, что в кишечнике млекопитающих функциональная роль М<sub>2</sub>-рецепторов является предметом дискуссий и, вероятно, определяется видом животного [12, 32, 33]. С одной стороны, чувствительность к карбахолу, а также сократительные реакции препаратов кишечника на стимуляцию электрическим полем были существенно снижены у мышей, нокаутных по гену М<sub>2</sub>-рецептора, по сравнению с этими показателями у животных дикого типа [8, 34]. Вместе с тем, не было выявлено прямого влияния М<sub>2</sub>-рецепторов в опосредование реакций сокращения кишечника морской свинки [29, 35] и лошади [15], что согласуется с результатами нашего исследования. Показано, что влияние ацетилхолина на М<sub>2</sub>-рецепторы может усиливать его эффекты через М<sub>3</sub>-рецепторы. Последнее связано с активацией неселективных катионных каналов семейства TRPC (Transient Receptor Potential (C – canonical), семейство каналов транзиторного рецепторного потенциала) и деполяризацией гладкомышечных клеток [8, 12]. Кроме того, есть мнение, что функциональная роль М<sub>2</sub>-рецепторов в гладкой мышце кишечника заключается в ограничении реакций расслабления, например, при стимуляции аденилатциклазы (АЦ) агонистами β-адренорецепторов [36, 37], то есть вклад М<sub>2</sub>-рецепторов в холинергическое сокращение зависит от активности АЦ в гладкомышечных клетках. Возможно, базальная активность АЦ в гладкой мышце кишечника трески невелика, по крайней мере, в условиях наших экспериментов. Таким образом, в кишечнике беломорской трески активация М<sub>2</sub>-рецепторов не оказывает прямого сократительного влияния, однако нельзя исключать модуляторной роли этих рецепторов, что является предметом будущих исследований.

Блокада М<sub>1</sub>-рецепторов с помощью пирензепина приводила к уменьшению вызванных ацетилхолином сократительных реакций препаратов

кишечника трески, хотя влияние пирензепина было менее выраженным, чем блокатора  $M_3$ -рецепторов 4-DAMP. В ряде исследований экспрессия  $M_1$ -рецепторов была продемонстрирована в энтеральных холинергических нейронах, а не в гладкомышечных клетках [28, 38, 39]. В соответствии с этим, не было обнаружено функционального вклада  $M_1$ -рецепторов на уровне гладкой мышцы в кишечнике мыши: карбахол не вызывал сокращения кишечника мышей, нокаутных сразу по двум подтипам мускариновых рецепторов –  $M_2$  и  $M_3$  [8]. В то же время, в работах других авторов сократительные ответы препаратов гладкой мускулатуры кишечника лошади и крысы на ацетилхолин были снижены на фоне пирензепина [14, 15], что соотносится с результатами нашего исследования и предполагает наличие вклада  $M_1$ -рецепторов в регуляцию холинергического сокращения кишечника беломорской трески. Возможно, вклад  $M_1$ -рецепторов в регуляцию холинергического сокращения кишечника зависит от вида животного.

В данной работе мы не исследовали эффекты блокады двух остальных подтипов М-холинорецепторов ( $M_4$  и  $M_5$ ), которые также могут экспрессироваться в кишечнике млекопитающих, хотя и в небольшом количестве [40, 41]. Однако значительный вклад этих подтипов в вызванное ацетилхолином сокращение препаратов кишечника трески маловероятен, судя по ярко выраженному эффекту блокады  $M_3$ -холинорецепторов.

**Сократительное влияние ацетилхолина в кишечнике беломорской трески реализуется с участием фермента Rho-киназы.** Rho-киназа – фермент, активность которого играет ключевую роль в регуляции тонического сокращения гладких мышц: активность Rho-киназы способствует поддержанию сокращения даже в условиях низкой концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме [17]. Неудивительно, что содержание, активность и функциональный вклад Rho-киназы высоки в гладких мышцах, относящихся к тоническому типу, т.е. способных поддерживать длительное сокращение [42]. Тем не менее, в ряде исследований на млекопитающих показан функциональный вклад Rho-киназы в регуляцию холинергического сокращения гладких мышц фазического типа [21, 22], к которому относится гладкая мускулатура кишечника (за исключением сфинктеров).

Мы впервые исследовали функциональный вклад Rho-киназы в гладкой мускулатуре кишечника рыб. Действие ингибитора Rho-киназы фасудила приводило к уменьшению амплитуды и длительности сократительных ответов кишечника трески на ацетилхолин. Влияние фасудила на длительность реакции согласуется с ключевой ролью Rho-киназы в поддержании тонического сокращения гладких мышц по механизму каль-

циевой сенситизации и, по всей видимости, связано со снижением активности фосфатазы легких цепей миозина [17, 42]. Сходным образом, ингибиторы Rho-киназы подавляли тоническую фазу сократительных реакций гладких мышц пищевода кошки [22], желудка лягушки [18], кишечника морской свинки [20], крысы [19] и мыши [21] на агонисты М-холинорецепторов или стимуляцию электрическим полем. Снижение амплитуды быстрой фазы сокращения под действием ингибиторов Rho-киназы также было продемонстрировано в ряде работ на гладкомышечных препаратах желудочно-кишечного тракта млекопитающих [19, 21, 22], что согласуется с нашими данными для кишечника трески. Такое быстрое действие фасудила (падение амплитуды реакции) может быть связано с тем, что исходно активная или активирующаяся под действием ацетилхолина Rho-киназа способствует открытию потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа [43] или неселективных катионных каналов [21, 44], что в итоге приводит к дополнительному входу ионов кальция в клетку. Быстрое влияние Rho-киназы на концентрацию  $Ca^{2+}$  в цитоплазме может быть важным механизмом регуляции сокращения гладкой мускулатуры фазического типа.

Таким образом, мы охарактеризовали механизмы регуляции сократительной активности кишечника под действием ацетилхолина, которые ранее были известны для млекопитающих, но не описаны для костистых рыб. Мы показали, что  $M_1$ - и, особенно,  $M_3$ -, но не  $M_2$ -рецепторы, являются посредниками сократительного влияния ацетилхолина на гладкую мускулатуру кишечника беломорской трески. Кроме того, мы впервые продемонстрировали роль Rho-киназы в регуляции холинергического сокращения гладкой мускулатуры кишечника трески. Полученные данные дополняют и развивают современные представления о сравнительной физиологии пищеварения, необходимы для понимания механизмов влияния повреждающих факторов на организм костистых рыб в условиях ухудшающейся экологии и глобального потепления, а также могут быть использованы при исследовании механизмов влияния лекарственных препаратов в рамках доклинических исследований.

Исследование выполнено в рамках научного проекта Государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М.В. Ломоносова № 121032300071-8. Проведение экспериментов осуществлялось с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shahjahan M., Taslima K., Rahman M.S., Al-Emran M., Alam S.I., Faggio C.* Effects of heavy metals on fish physiology – A review // *Chemosphere*. 2022. Vol. 300: 134519.
2. *Pasparakis C., Esbaugh A.J., Burggren W., Grosella M.* Impacts of deepwater horizon oil on fish // *Comp. Biochem. Physiol. Part – C: Toxicol. Pharmacol.* 2019. Vol. 224: 108558.
3. *Cueto-Escobedo J., German-Ponciano L.J., Guillén-Ruiz G., Soria-Fregozo C., Herrera-Huerta E.V.* Zebrafish as a useful tool in the research of natural products with potential anxiolytic effects // *Front. Behav. Neurosci.* 2022. Vol. 15: 795285.
4. *Karila P., Shahbazi F., Jensen J., Holmgren S.* Projections and actions of tachykinergic, cholinergic, and serotonergic neurones in the intestine of the Atlantic cod // *Cell Tissue Res.* 1998. Vol. 291. N 3. P. 403–413.
5. *Olsson C., Holmgren S.* Autonomic control of gut motility: A comparative view // *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 2011. Vol. 165. N 1. P. 80–101.
6. *Jensen J., Holmgren S.* Neurotransmitters in the intestine of the atlantic cod, *Gadus morhua* // *Comp. Biochem. Physiol. Part – C: Toxicol. Pharmacol.* 1985. Vol. 82. N 1. P. 81–89.
7. *Gómez A., Martos F., Bellido I., Marquez E., García A. J., Pavia J., de la Cuesta F.S.* Muscarinic receptor subtypes in human and rat colon smooth muscle // *Biochem. Pharmacol.* 1992. Vol. 43. N 11. P. 2413–2419.
8. *Unno T., Matsuyama H., Sakamoto T., Uchiyama M., Izumi Y., Okamoto H., Yamada M., Wess J., Komori S.* M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice // *Br. J. Pharmacol.* 2005. Vol. 146. N 1. P. 98–108.
9. *Kerr P.M., Hillier K., Wallis R.M., Garland C.J.* Characterization of muscarinic receptors mediating contractions of circular and longitudinal muscle of human isolated colon // *Br. J. Pharmacol.* 1995. Vol. 115. N 8. P. 1518–1524.
10. *Ehlert F.J.* Contractile role of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle // *Life Sci.* 2003. Vol. 74. N 2–3. P. 355–366.
11. *Hu X.Q., Zhang L.* Function and regulation of large conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscle cells // *Drug Discov. Today*. 2012. Vol. 17. N 17–18. P. 974–987.
12. *Tanahashi Y., Komori S., Matsuyama H., Kitazawa T., Unno T.* Functions of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: A review of studies with receptor-knockout mice // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. N 2. P. 1–24.
13. *Tran J.A., Matsui M., Ehlert F.J.* Differential coupling of muscarinic M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, and M<sub>3</sub> receptors to phosphoinositide hydrolysis in urinary bladder and longitudinal muscle of the ileum of the mouse // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. Vol. 318. N 2. P. 649–656.
14. *Glaza I., Szadujkis-Szadurski L., Szadujkis-Szadurski R., Gajdus M., Olkowska J.* Modulating activity of M<sub>1</sub> receptor to the reaction of ileal smooth muscle // *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2011. Vol. 65. P. 478–481.
15. *Menozzi A., Pozzoli C., Poli E., Bontempi G., Serventi P., Meucci V., Intorre L., Bertini S.* Role of muscarinic receptors in the contraction of jejunal smooth muscle in the horse: An *in vitro* study // *Res. Vet. Sci.* 2017. Vol. 115. P. 387–392.
16. *Karaki H., Weiss G.B.* Calcium release in smooth muscle // *Life Sci.* 1988. Vol. 42. N 2. P. 111–122.
17. *Somlyo A.P., Somlyo A.V.* Ca<sup>2+</sup> 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.
18. *Sahin L., Cevik O.S., Koyuncu D.D., Buyukafsar K.* Role of rho-kinase (ROCK) in tonic but not phasic contraction in the frog stomach smooth muscle // *Life Sci.* 2018. Vol. 198. P. 46–55.
19. *Loirand G., Cario-Toumaniantz C., Chardin P., Pacaud P.* The Rho-related protein Rnd1 inhibits Ca<sup>2+</sup> sensitization of rat smooth muscle // *J. Physiol.* 1999. Vol. 516. N 3. P. 825–834.
20. *Swärd K., Dreja K., Susnjar M., Hellstrand P., Hartshorne D.J., Walsh M.P.* Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum // *J. Physiol.* 2000. Vol. 522. N 1. P. 33–49.
21. *Bayguinov O., Dwyer L., Kim H., Marklew A., Sanders K. M., Koh S.D.* Contribution of Rho-kinase to membrane excitability of murine colonic smooth muscle // *Br. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 163. N 3. P. 638–648.
22. *Park S.Y., Song H.J., Sohn U.D.* Participation of Rho-associated kinase in electrical stimulated and acetylcholine-induced contraction of feline esophageal smooth muscle // *Eur. J. Pharmacol.* 2009. Vol. 607. N 1–3. P. 220–225.
23. *Rattan S., Phillips B.R., Maxwell P.J.* RhoA/Rho-Kinase: pathophysiologic and therapeutic implications in gastrointestinal smooth muscle tone and relaxation // *Gastroenterology*. 2010. Vol. 138. N 1. P. 13–18.
24. *Андрюшин А.П.* Рыбы северных морей СССР. М.: Л.: Изд-во Акад. наук СССР, 1954. 567 с.
25. *Kitazawa T., Itoh K., Yaosaka N., Maruyama K., Matsuda K., Teraoka H., Kaiya H.* Ghrelin does not affect gastrointestinal contractility in rainbow trout and goldfish *in vitro* // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012. Vol. 178. N 3. P. 539–545.
26. *Kitazawa T., Hoshi T., Chugun A.* Effects of some autonomic drugs and neuropeptides on the mechanical activity of longitudinal and circular muscle strips isolated from the carp intestinal bulb (*Cyprinus carpio*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part – C: Toxicol. Pharmacol.* 1990. Vol. 97. N 1. P. 13–24.
27. *Karila P., Holmgren S.* Enteric reflexes and nitric oxide in the fish intestine // *J. Exp. Biol.* 1995. Vol. 198. N 11. P. 2405–2411.
28. *Harrington A.M., Peck C.J., Liu L., Burcher E., Hutson J. M., Southwell B.R.* Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon // *Neurogastroenterol. Motil.* 2010. Vol. 22. N 9: 999–e263.
29. *Honda K., Takano Y., Kamiya H.* Pharmacological profiles of muscarinic receptors in the longitudinal smooth muscle of guinea pig ileum // *Jpn. J. Pharmacol.* 1993. Vol. 62. N 1. P. 43–47.
30. *Tobin G., Giglio D., Lundgren O.* Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract // *J. Physiol. Pharmacol.* 2009. Vol. 60. N 1. P. 3–21.

31. Hu J., Gao W.Y., Ma L., Man S.L., Huang L.Q., Liu C.X. Activation of M<sub>3</sub> muscarinic receptor and Ca<sup>2+</sup> influx by crude fraction from *Crotonis Fructus* in isolated rabbit jejunum // J. Ethnopharmacol. 2012. Vol. 139. N 1. P. 136–141.
32. Harrington A.M., Hutson J.M., Southwell B.R. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system // Prog. Histochem. Cytochem. 2010. Vol. 44. N 4. P. 173–202.
33. Uchiyama T., Chess-Williams R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract // J. Smooth Muscle Res. 2004. Vol. 40. N 6. P. 237–247.
34. Unno T., Matsuyama H., Izumi Y., Yamada M., Wess J., Komori S. Roles of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice // Br. J. Pharmacol. 2006. Vol. 149. N 8. P. 1022–1030.
35. Griffin M.T., Matsui M., Ostrom R.S., Ehlert F.J. The guinea pig ileum lacks the direct, high-potency, M<sub>2</sub>-muscarinic, contractile mechanism characteristic of the mouse ileum // Naunyn. Schmiedeberg. Arch. Pharmacol. 2009. Vol. 380. N 4. P. 327–335.
36. Griffin M.T., Ehlert F.J. Specific inhibition of isoproterenol-stimulated cyclic AMP accumulation by M<sub>2</sub> muscarinic receptors in rat intestinal smooth muscle // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992. Vol. 263. N 1. P. 221–225.
37. Reddy H., Watson N., Ford A.P.D.W., Eglan R.M. Characterization of the interaction between muscarinic M<sub>2</sub> receptors and  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in guinea-pig isolated ileum // Br. J. Pharmacol. 1995. Vol. 114. N 1. P. 49–56.
38. North R.A., Slack B.E., Surprenant A. Muscarinic M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> receptors mediate depolarization and presynaptic inhibition in guinea-pig enteric nervous system // J. Physiol. 1985. Vol. 368. N 1. P. 435–452.
39. Harrington A.M., Hutson J.M., Southwell B.R. Immunohistochemical localisation of cholinergic muscarinic receptor subtype 1 (M1r) in the guinea pig and human enteric nervous system // J. Chem. Neuroanat. 2007. Vol. 33. N 4. P. 193–201.
40. Delvalle N.M., Fried D.E., Rivera-Lopez G., Gaudette L., Gulbransen B.D. Cholinergic activation of enteric glia is a physiological mechanism that contributes to the regulation of gastrointestinal motility // Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol. 2018. Vol. 315. N 4. P. G473–G483.
41. Takeuchi T., Fujinami K., Goto H., Fujita A., Taketo M.M., Manabe T., Matsui M., Hataet F. Roles of M<sub>2</sub> and M<sub>4</sub> muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum // J. Neurophysiol. 2005. Vol. 93. N 5. P. 2841–2848.
42. Patel C.A., Rattan S. Spontaneously tonic smooth muscle has characteristically higher levels of RhoA/ROK compared with the phasic smooth muscle // Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol. 2006. Vol. 291. N 5. P. 830–837.
43. Shabir S., Borisova L., Wray S., Burdyga T. Rho-kinase inhibition and electromechanical coupling in rat and guinea-pig ureter smooth muscle: Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent mechanisms // J. Physiol. 2004. Vol. 560. N 3. P. 839–855.
44. Kim B.J., Jeon J.H., Kim S.J., So I. Role of calmodulin and myosin light chain kinase in the activation of carbachol-activated cationic current in murine ileal myocytes // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2007. Vol. 85. N 12. P. 1254–1262.

Поступила в редакцию 02.08.2022

После доработки 11.10.2022

Принята в печать 24.10.2022

## RESEARCH ARTICLE

## Mechanisms of the White Sea cod *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae) intestinal smooth muscle cholinergic contraction: the contribution of various subtypes of M-cholinergic receptors and Rho-kinase

A.A. Shvetsova<sup>1,\*</sup> , G.V. Morgunova<sup>2</sup> , E.A. Novoderezhkina<sup>1</sup> , V.M. Potekhina<sup>1</sup> ,  
A.A. Kamensky<sup>1</sup> , O.S. Tarasova<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Human and Animal Physiology and <sup>2</sup>Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

\*e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

The study of the functioning of various body systems in different vertebrates is one of the key tasks of comparative physiology. Teleost fish are a large group of vertebrates, however, the mechanisms of functioning of their digestive tract have been studied little and mainly only for such a model object as *Danio rerio*. The aim of this work was to characterize the participation of various subtypes of M-cholinergic receptors and the enzyme Rho-kinase in the cholinergic contraction of the intestinal smooth muscles of the White Sea cod *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae). A longitudinal strip was excised from the proximal cod intestine and placed in an apparatus for recording contractile responses in the isometric mode. Contractile responses to acetylcholine were completely blocked by atropine. Blockade of M<sub>3</sub> cholinergic receptors with 4-DAMP resulted in a decrease in acetylcholine-induced contraction compared with the control

response. Blockade of  $M_1$  receptors with pirenzepine led to a weakening of contraction, less pronounced than with blockade of  $M_3$  cholinergic receptors. Blockade of  $M_2$ -cholinergic receptors with methoctramine did not affect the magnitude of the contractile response. Incubation of preparations with the Rho-kinase inhibitor fasudil was accompanied by a significant decrease in contractile responses compared with the control, as well as a faster decrease in the contraction force after reaching the “peak” of the reaction. Thus, acetylcholine causes contraction of cod intestinal smooth muscle by activating  $M_3$ - and  $M_1$ - but not  $M_2$ -cholinergic receptors. The activity of the Rho-kinase enzyme contributes to the development and maintenance of cod intestinal smooth muscle contraction under the action of acetylcholine. The results obtained are of interest for comparative physiology, may be important for understanding the mechanisms of the damaging effect of environmental factors on the bony fish’ body, as well as for the use of fish as objects of preclinical studies of drugs.

**Keywords:** *Gadus morhua marisalbi*, smooth muscle, intestine, acetylcholine, muscarinic receptors, Rho-kinase

**Funding:** The research was carried out as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University, project number 121032300071-8.

### Сведения об авторах

*Швецова Анастасия Алексеевна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8859-7689>

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

*Новодережкина Евгения Алексеевна* — соискатель, кафедра общей и клинической фармакологии Российского университета дружбы народов. Тел.: 8-499-936-87-87; e-mail: evgeniyanovoderezhkina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7657-5973>

*Потехина Виктория Маратовна* — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: vm-potekhina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2319-9396>

*Каменский Андрей Александрович* — докт. 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: <https://orcid.org/0000-0001-6496-0527>

*Тарасова Ольга Сергеевна* — докт. биол. наук, доц., 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/0000-0002-4230-384>

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.214

## Влияние односторонних разрывов ДНК на транскрипцию нуклеосом

Н.С. Герасимова<sup>1, \*</sup> , М.С. Ахтар<sup>2</sup>, В.М. Студитский<sup>1, 3</sup> <sup>1</sup>Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>Molecular and Structural Biology Division, CSIR-Central Drug Research Institute, Lucknow 226031, Uttar Pradesh, India;<sup>3</sup>Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

\*e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Ранее в исследованиях было показано, что односторонний разрыв нематричной цепи ДНК может вызывать остановку транскрибирующей РНК-полимеразы, но только при организации ДНК в нуклеосому. Наблюдаемый эффект объясняли в рамках модели транскрипции хроматина с образованием внутринуклеосомных петель — интермедиатов, в которых фермент оказывается остановленным в петле ДНК на гистоновом октамере. Согласно указанной модели, разрыв цепи ослабляет возникающее в ходе транскрипции напряжение структуры ДНК, что вызывает стабилизацию ДНК-гистоновых взаимодействий и арест РНК-полимеразы. В данной работе продолжено определение границ таких внутринуклеосомных петель и обнаружено, что образование контактов ДНК с гистонами позади фермента происходит на расстоянии не менее 17 пар нуклеотидов от активного центра.

**Ключевые слова:** транскрипция, хроматин, нуклеосома, внутринуклеосомная петля, РНКП 2, разрыв ДНК, репарация, односторонний разрыв

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-241-247

Односторонние разрывы ДНК — одни из наиболее часто возникающих в клетке повреждений. Целостность сахарофосфатного остова ДНК нарушается в ходе различных процессов клеточного метаболизма (спонтанного гидролиза, реакций с радикалами, нарушения действия топоизомераз, репарации ДНК путем удаления оснований или нуклеотидов и др.) [1, 2]. Накапливающиеся односторонние разрывы могут препятствовать успешному протеканию транскрипции, репликации и репарации ДНК, вызывать накопление двусторонних разрывов и увеличивать геномную нестабильность. Нарушение системы репарации таких повреждений может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний [2, 3].

Разрыв матричной цепи ДНК в значительной степени ингибирует элонгацию транскрипта различными РНК-полимеразами (РНКП) *in vitro* и *in vivo* — РНКП 2 эукариот, РНКП *Escherichia coli*, а также бактериофагов SP6 и T7 [4–6]. Остановка РНКП у эукариот служит сигналом для начала репарации, однако при нарушениях комплементарной цепи такого ингибирования не наблюдается [7]. Ранее в экспериментальной системе *in vitro* было показано, что одиночные разрывы нематричной цепи ДНК также могут вызывать эффективную остановку РНКП, но только при организации ДНК в нуклеосому [8] — ДНК-белковый комплекс, составляющий наименьшую единицу надмолекулярной структурной организации ДНК эукариот (хроматина). Нуклеосома состоит из

участка ДНК длиной 145–147 п.н., накрученного на октамер белков-гистонов, включающий центральный тетрамер (H3-H4)<sub>2</sub> и два димера H2A-H2B [9]. Несмотря на то что хроматин удаляется при активации генов в живых клетках, кодирующие области умеренно транскрибируемых генов остаются упакованными в нуклеосомы [10] — таким образом, РНКП 2 встречается с нуклеосомами во время элонгации транскриптов, и обнаруженный эффект разрывов нематричной цепи на продвижение фермента может иметь важное биологическое значение.

Ранее [8] было показано, что места остановки РНКП при транскрипции нуклеосом с разрывами нематричной цепи ДНК дискретны, расположены после разрыва и имеют выраженную периодичность 10-п.н. внутри нуклеосомы (+24, +34 и +44 п.н. относительно ближайшей к промотору границы), а сила ингибирования фермента зависит от положения разрыва относительно места остановки. Наблюдаемый эффект объясняли в рамках модели транскрипции хроматина с образованием внутринуклеосомных петель — интермедиатов, в которых фермент оказывается остановленным в петле ДНК на гистоновом октамере [8, 11]. Остановки фермента при транскрипции нуклеосом в присутствии одиночных разрывов нематричной цепи ДНК, предположительно, вызваны релаксацией напряжения в небольших внутринуклеосомных петлях ДНК, которое в норме способствует транскрипции. Согласно модели, разрыв цепи уменьшает

вызываемое транскрипцией напряжение в структуре ДНК и затрудняет раскрытие петли и дальнейшую элонгацию.

В данной работе продолжено изучение размера таких внутринуклеосомных петель. Для этого получены нуклеосомы с одонитевым разрывом нематричной цепи в новом положении — +7 — и проведена их транскрипция *in vitro*. Предполагается, что образование контактов ДНК и гистонов позади РНКП происходит на расстоянии не менее 17 п.н. В живых организмах описываемый эффект может ускорять репарацию разрывов нематричной цепи ДНК, которые в других случаях могут оставаться незаметными для системы репарации из-за взаимодействия с гистонами.

### Материалы и методы

**Матрица ДНК.** Работу проводили на позиционирующей нуклеосоме последовательности 603 [12], которая была точно изменена для внесения участка узнавания ферментом-никазой *Nt.BsmA1*. Фрагмент ДНК также включал дополнительный участок ДНК 123-п.н. с введенной на 5'-конец флуоресцентной меткой FAM с одной стороны и дополнительный участок 13-п.н. с другой стороны:

5'FAMd(CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTATAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACACGGCGAAAGGCCAACCCAAAGCGACACCGGCACTGGGGCGTCTCT^CGCGCGCCCGCCTACCGTGTGAAGTCGTCACCTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACACCGTGCATCGATGTTGGAAGAGGGCCCTCCGTCCTGAATTCTTCAAGTCCCTGGGGTACGGATCCGACG)3' (последовательность 603 подчеркнута, сайт узнавания *Nt.BsmA1* выделен полужирным шрифтом, место разрезания сахарофосфатного остова указано знаком ^). Плазмида, содержащая позиционирующую нуклеосому последовательность 603 [12], была любезно предоставлена доктором Джоном Видомом (J. Widom).

**Амплификация фрагментов ДНК.** Необходимое количество ДНК получали методом полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно меченого олигонуклеотида FAM-282Forwhst (5'-FAM-d(CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTA)-3') и немеченого олигонуклеотида 282Revwhst (5'-d(CGTCGGATCCGTACCCAGGGACTT)-3') (0,5 мкМ каждый) (Синтол, Россия). Реакцию проводили в 1× буфере для Taq-ДНК-полимеразы, содержащем 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, дезоксирибонуклеотиды в концентрации 0,2 мМ каждого и Taq-ДНК-полимеразу в концентрации 0,05 ед. акт./мкл (все реактивы — Евроген, Россия). Пробы инкубировали 3 мин при 95°C, 30 циклов повторения 93°C (10 с), 63°C (20 с), 72°C (20 с) и дополнительно 7 мин при 72°C в программируемом термостате Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, США).

Продукты амплификации ожидаемой длины (282 п.н.) очищали от компонентов реакции электрофоретически в 1%-ном агарозном геле с использованием 0,5× буфера TBE в камере для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, США). Для экстракции ДНК из геля использовали коммерческий набор реагентов QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Голландия).

**Внесение одонитевого разрыва.** Полученную ДНК инкубировали с ферментом-никазой *Nt.BsmA1* в буфере CutSmart (NEB, США) и очищали набором QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Голландия). Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически с использованием оборудования Nanodrop 2000c UV-Vis CC (Thermo Fisher Scientific, США). Эффективность реакции определяли методом электрофореза в 8%-ном ПААГ (полиакриламидный гель; соотношение акриламида и бисакриламида 19:1) в денатурирующих условиях в присутствии мочевины в концентрации 8М с использованием 0,5× буфера TBE в камере для вертикального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, США). Определение длины одноцепочечных фрагментов ДНК проводили по метке FAM, внесенной на 5'-конец в составе олигонуклеотида 282Forwhst, с помощью системы детекции флуоресценции Amersham Typhoon (Cytiva, Швеция). ДНК-фрагменты с разрывами, внесенными с эффективностью не менее 95%, очищали от фермента и реактивов с использованием набора QIAquick PCR Purification Kit.

**Сборка нуклеосом на анализируемых фрагментах ДНК.** Нуклеосомы собирали на полученных фрагментах ДНК в ходе ступенчатого диализа против буферных растворов с уменьшающейся ионной силой в присутствии источника октамеров гистонов — хроматина без линкерных гистонов, выделенного из эритроцитов цыплят согласно протоколу, подробно описанному ранее [14]. Так, в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl pH 7,5, 0,1% NP-40, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанол и 1М NaCl, смешивали фрагменты ДНК и хроматин в соотношении 1:4 по массе ДНК (например, 2 мкг синтетических фрагментов и 8 мкг хроматина). Диализ проводили при температуре 4°C против буферных растворов, содержащих 10 мМ Трис-НСl pH 7,5, 0,1% NP-40, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанол и хлористый натрий в понижающейся концентрации (1М в первом буфере, инкубация 1 ч; 0,75М — 1 ч; 0,5М — 2,5 ч; 0,01 М — ночь). Анализ продуктов сборки проводили методом электрофоретического разделения в 4,5%-ном ПААГ с использованием 0,5× буфера TBE в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Условия процедуры подбирали так, чтобы минимизировать количество свободной ДНК. В дальнейшей работе использовали только смеси, содержащие не менее 90% мононуклеосом.

**Очистка РНК-полимеразы *E. coli*.** РНКП очищали по методике [13]. Кратко, клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали плазмидой pVS1, несущей гены альфа-, бета-, бета'- и омега-субъединиц РНКП с внесенным в одну из них гистидиновым тэгом. Культуру выращивали в объеме 2 л в течение 16 ч с проведением индукции экспрессии. Клетки собирали центрифугированием и лизировали под действием ультразвука. Проводили хроматографию на носителе Ni Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva, США). Фракции, содержащие РНКП, использовали для дальнейшей аффинной хроматографии на гепариновом носителе Heparin Hyper D (Sartorius, Германия). Последний этап очистки включал ионообменную хроматографию на колонке MonoQ 5/5 HR (объем 1 мл, Pharmacia, США). Фракции с РНКП собирали, фермент хранили в буфере, состоящем из 30 мМ TrisHCl, pH 8,0, 50% глицерина, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ бета-меркаптоэтанола, 20 мМ NaCl.

**Транскрипция нуклеосом РНК-полимеразой *E. coli*.** Транскрипцию РНКП (200 нМ) начинали с формирования открытого комплекса на матрице (40 нМ) в транскрипционном буфере TB40 (20 мМ Tris HCl, pH 7,9, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 40 мМ KCl и 1 мМ бета-меркаптоэтанол) в ходе инкубации 7 мин при 37°C. Элонгационные комплексы с 11-мерной РНК (ЭК-39, число обозначает расположение активного центра фермента относительно промотор-проксимальной границы нуклеосомы) формировали добавлением затравочного тририбонуклеотида 5'-ApUpC, АТФ до 20 мкМ и  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-ГТФ (3000 Ci/mmol) в буфере TB40 (10 мин при температуре 25°C). Затем добавляли немеченый ГТФ до концентрации 20 мкМ и продолжали реакцию 5 мин в тех же условиях. Для предотвращения повторной инициации в реакционную смесь добавляли рифампицин (20 мкг/мл). Транскрипцию продолжали добавлением всех рибонуклеотидтрифосфатов до концентрации 200 мкМ каждого в транскрипционном буфере с различным содержанием KCl в течение ограниченного времени (точная концентрация KCl и время реакции указаны в разделе «Результаты исследований»). Реакционную смесь обрабатывали взбалтыванием с фенолом, насыщенным цитратным буфером pH 4,3 (Sigma-Aldrich, США). После центрифугирования проб в течение 10 мин при максимальных оборотах в настольной центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) водную фазу отбирали, добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (pH 5,2), гликоген (Thermo Fisher Scientific, США) до концентрации 0,2 мг/мл и 3 объема 96%-ного этилового спирта. После 18-часовой инкубации при -20°C нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием при +4°C в течение 20 мин при максимальных оборотах (13200 об./мин) в настольной центрифуге 5415R (Eppendorf, Германия).

Продукты РНК анализировали электрофоретическим разделением в 8%-ном ПААГ (соотношение акриламида и бисакриламида 19:1) в денатурирующих условиях в присутствии мочевины в концентрации 8М с использованием 0,5× буфера TBE в камере для вертикального электрофореза Sequi-Gen GT Sequencing Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Пробы растворяли в буфере, содержащем 95% формамида, 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), 0,01% бромфенолового синего и 0,01% ксиленианола. Перед нанесением пробы прогревали 5 мин при 95°C, тщательно перемешивая. Распределение продуктов в геле анализировали с помощью системы детекции радиоактивного распада <sup>32</sup>P флуоресцентного сканера Typhoon Trio (General Electric, Великобритания). Было проведено по три независимых эксперимента. Количественный анализ проводили с использованием программного обеспечения Fiji ImageJ (США), предел погрешностей определялся как стандартное отклонение значений в выборке.

### Результаты и обсуждение

**Экспериментальная система транскрипции хроматина *in vitro*.** В данной работе процесс транскрипции хроматина с однонитевыми разрывами нематричной цепи ДНК изучался в экспериментальной системе с использованием собранных на коротких фрагментах ДНК одиночных нуклеосом (рис. 1А) [14]. Для точного позиционирования октамера гистонов в ДНК была внесена высокоаффинная к гистонам последовательность 603. Такие нуклеосомы представляют собой асимметричный барьер для РНКП 2 [15], то есть его высота зависит от ориентации последовательности относительно промотора. Здесь была использована так называемая «пропускающая» ориентация, которая лучше воспроизводит свойства транскрипции *in vivo*, такие как сохранение тетрамера гистонов (H3-H4)<sub>2</sub> на ДНК и потеря части димеров гистонов H2A-H2B [16, 17]. В экспериментах использовали РНКП *E. coli*, которая воспроизводит специфический для РНКП 2 механизм транскрипции через нуклеосому, в том числе в присутствии однонитевых разрывов нематричной цепи [8, 15, 17, 18]. РНКП была очищена в виде холофермента с сигма70-субъединицей, для инициации транскрипции в ДНК был внесен сигма(70)-зависимый промотор T7A1.

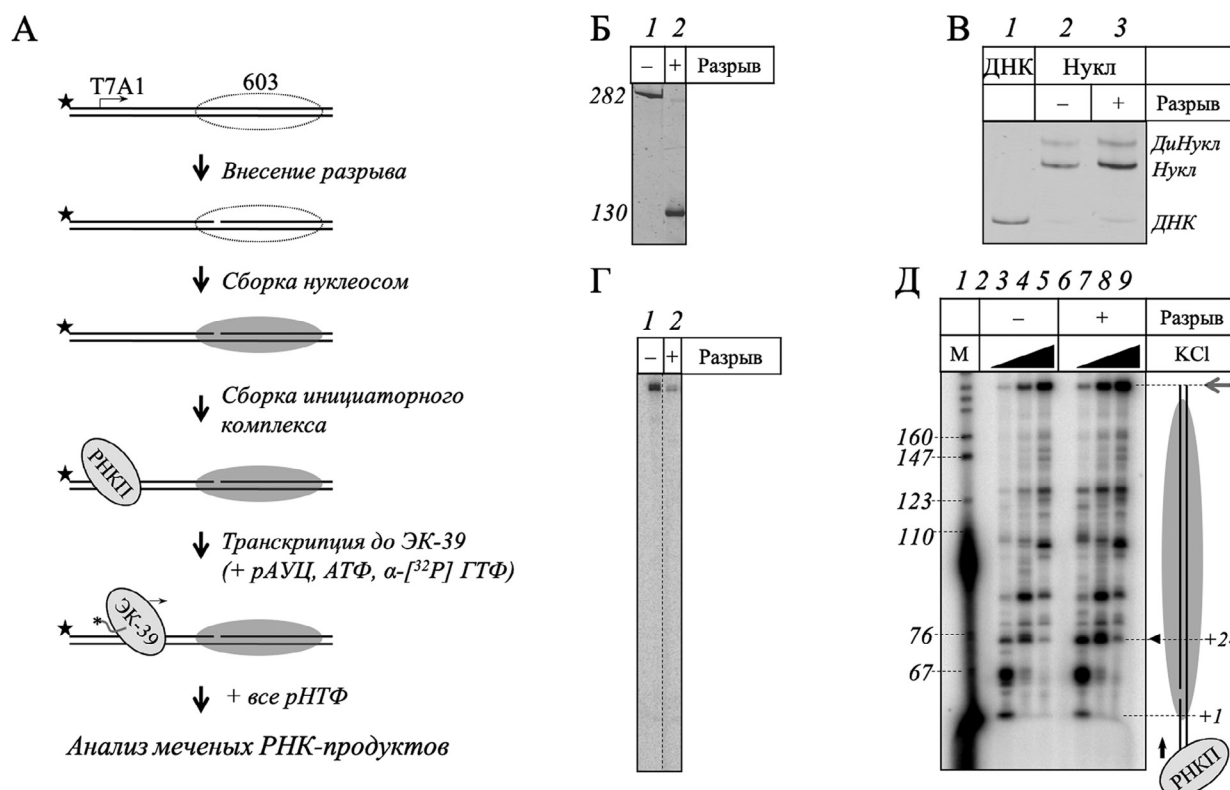
Методом ПЦР были получены фрагменты ДНК, включающие промотор T7A1 и модифицированную последовательность 603 (рис. 1В, дорожка «ДНК»; на рис. 1Б приведены результаты внесения однонитевого разрыва в ходе инкубации с никазой). На ДНК с разрывами и без были собраны нуклеосомы (рис. 1В, дорожки «Нукл»). Продукты диализа включали моонуклеосомы и динуклеосомы (указаны на рисунке как «Нукл» и «ДиНукл» соответственно). В случае образования динуклео-

сомной структуры второй гистоновый октамер взаимодействует с промоторным участком, поэтому на таких фрагментах не происходит инициация транскрипции и их присутствие не влияет на результаты транскрипционных экспериментов.

**Разрыв +7 вызывает замедление РНКП при транскрипции нуклеосом.** Контрольные эксперименты по транскрипции свободной от гистонов ДНК в течение 2 мин при разной ионной силе раствора (использованы концентрации KCl в реакционной смеси 40, 150 и 300 мМ) показали, что разрыв между 7 и 8 нуклеотидными остатками последовательности 603 от границы, ближайшей к промотору (далее +7), не влияет на элонгацию

модельной РНКП *E. coli*. Скорость продвижения фермента вдоль матричной ДНК с разрывами в исследуемом участке не отличалась от наблюдаемой на неповрежденной ДНК (рис. 1Г, показаны результаты транскрипции при 40 мМ KCl).

Нуклеосомы с разрывом и без транскрибировали в течение 2 мин после образования ЭК-39 при различных концентрациях KCl (40, 150 и 300 мМ). Результаты экспериментов показали, что при организации в нуклеосому тот же одиночный разрыв вызывает дополнительное замедление РНКП (рис. 1Д). Оказалось, что разрыв +7 вызывает остановку РНКП в том же положении, что и уже исследованные ранее +12 и +17 [8] — при



**Рис. 1.** Разрыв нематричной цепи ДНК в положении +7 п.н. относительно входа в нуклеосому вызывает замедление РНК-полимеразы при транскрипции нуклеосомной ДНК. **А** — экспериментальная система транскрипции хроматина *in vitro*. Матрица ДНК включает σ70-зависимый промотор Т7А1 для РНК-полимеразы *Escherichia coli* и позиционирующую октамер гистонов последовательность 603 ([12], показана овалом). В последовательность 603 внесен участок узнавания ферментом-никазой. В ДНК вносят разрыв, на фрагментах ДНК собирают нуклеосомы. Для определения эффективности внесения разрыва на 5'-конец нематричной цепи внесена флуоресцентная метка FAM (схематически изображена звездочкой). Последовательность нуклеотидов в точке старта транскрипции (указана стрелкой) позволяет проводить радиоактивное пульс-мечение продуктов для последующего количественного анализа. После мечения в присутствии ограниченного набора рибонуклеотид-5-трифосфатов (рНТФ) транскрипцию продолжают в различных условиях. Полученные в ходе реакции РНК-продукты анализируют методом электрофореза в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) в денатурирующих условиях. **Б** — определение эффективности внесения разрыва в нематричную цепь ДНК методом ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях. Детекция флуоресцентного сигнала метки FAM, внесенной на 5'-конец нематричной цепи. После воздействия фермента-никазы *Nt.BsmA1* цепь разделяется на два более коротких участка — меченый и немеченый. **В** — сборка нуклеосом на ДНК. Электрофорез ДНК-белковых комплексов в ПААГ в нативных условиях. Детекция по включенной в ДНК флуоресцентной метке FAM. 1 — свободная от гистонов ДНК; 2 — нуклеосомы без повреждений; 3 — нуклеосомы с однонитевым разрывом +7. ДиНукл — динуклеосомы — комплексы со вторым октамером гистонов на промоторном участке. **Г** — результаты транскрипции свободной от гистонов ДНК в 40 мМ KCl в течение 2 мин (сигнал радиоактивного распада [<sup>32</sup>P]). 1 («-») — без разрыва, 2 («+») — с разрывом +7. **Д** — результаты транскрипции нуклеосом с неповрежденной ДНК («-») или с разрывом в положении +7 («+») в различных солевых условиях в течение 2 мин. Участок, при прохождении которого остановка усиливается (+24), отмечен треугольником-стрелкой. Полноразмерный транскрипт длиной 207 нуклеотидов отмечен серой стрелкой. Справа серым овалом схематически обозначено расположение гистонического октамера на ДНК-матрице и направление транскрипции (сигнал радиоактивного распада [<sup>32</sup>P]). 1 — М — радиоактивно меченые продукты расщепления плазмиды pBR322 эндонуклеазой *MspI*, длины указаны в нуклеотидах. 2 и 6 — элонгационный комплекс 39 на матрицах без разрыва и с разрывом соответственно. 3-5 и 7-9 — транскрипция в 40, 150 или 300 мМ KCl на матрицах без разрыва и с разрывом соответственно.

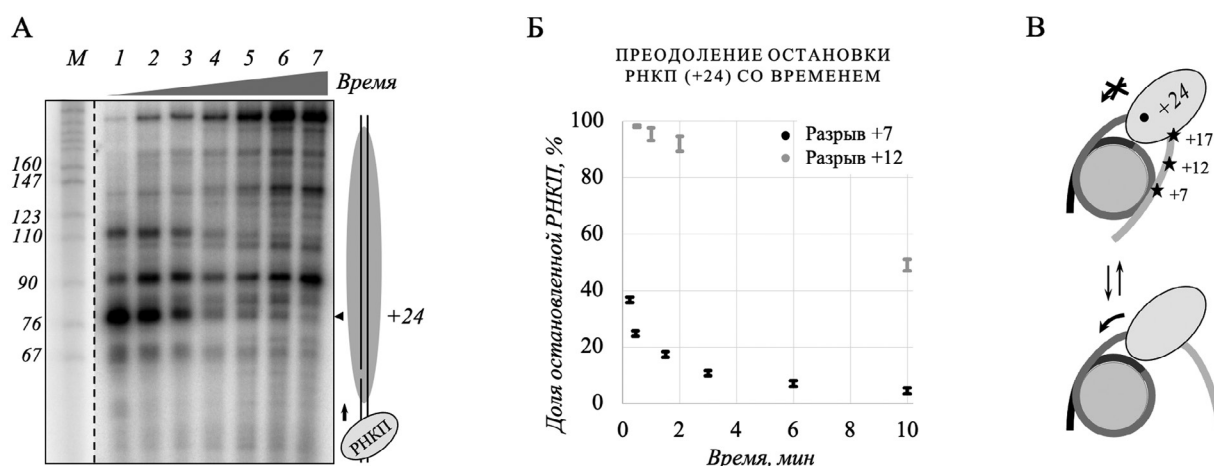
достижении активным центром фермента положения +24 — то есть его действие распространяется на 17 п.н. вперед по ходу транскрипции. Согласно полученным ранее данным [8, 11], место остановки оказалось определено не позицией самого разрыва, а положением активного центра РНКП. Так, в работе впервые показано влияние однонитевого разрыва, расположенного на расстоянии 17 п.н. от места остановки РНКП.

Эффект особенно хорошо выражен в условиях пониженной ионной силы (40 мМ КСl) и в физиологических солевых условиях (150 мМ КСl), он заметно ослабляется при повышении ионной силы (300 мМ КСl). Более эффективное продвижение фермента через нуклеосомные разрывы, скорее всего, объясняется дестабилизацией ДНК-гистоновых взаимодействий в буфере с более высокой ионной силой [19].

**Эффективность замедления РНКП в присутствии разрыва нематричной цепи нуклеосомной ДНК зависит от расположения повреждения и активного центра фермента.** Ранее было установлено, что разрыв +12 вызывает высокоэффективную остановку РНКП в положении +24 в физиологических солевых условиях ( $92,0 \pm 2,6\%$ ), в то время как разрыв +17 замедляет лишь  $39,5 \pm 5,0\%$  фермента в этом же положении [8]. Повреждение +17 находится всего за 7 п.н. до вызываемой им остановки фермента (+24). В работе [8] было предположено, что при достижении активным центром РНКП положения +24 разрыв +17 остается в транскрипционном «пузыре» — расплетенном участке матричной ДНК, полностью находящемся внутри РНКП, где структура ДНК может быть до-

полнительно стабилизирована самим ферментом. Возможно, в таком случае ослабление отрицательного суперскручивания, накапливаемого в замкнутой внутринуклеосомной петле, будет затруднено. В данной работе эффективность замедления РНКП в присутствии разрыва +7 была определена по результатам трех независимых экспериментов. В физиологических солевых условиях она составила всего около  $13,5 \pm 1,0\%$ . Так, для исследованных однонитевых разрывов эффективность остановки уменьшается в следующем порядке:  $+12 > +17 > +7$ . Возможно, вблизи положения +7 начинается формирование ДНК-гистоновых контактов позади фермента, которые стабилизируют ДНК вокруг разрыва. В рамках модели формирования внутринуклеосомных петель полученные данные свидетельствуют в пользу того, что, по-видимому, участки между активным центром фермента и границами ДНК-гистоновых взаимодействий имеют длину около 20 п.н., а общий размер петли составляет, соответственно, 40–60 нуклеотидов.

**Замедление РНКП в присутствии разрыва +7 относительно кратковременно.** Остановка в положении +24 в присутствии разрыва +12 крайне медленно преодолевается во времени [8]. В настоящей работе была изучена временная зависимость остановки РНКП в присутствии разрыва +7. Эксперименты проводились при концентрации КСl в транскрипционном буфере 150 мМ в течение ограниченного времени (30 с, 45 с, 90 с, 3 мин, 6 мин, 10 мин, 20 мин) (рис. 2А). Было определено, что остановка фермента успешно преодолевается через 3 мин после добавления всех рибонуклеотид-5-трифосфатов (рНТФ). Прове-



**Рис. 2.** Остановка РНК-полимеразы в присутствии разрыва нематричной цепи нуклеосомной ДНК в положении +7 относительно кратковременна. **А** — проведены эксперименты по транскрипции нуклеосом с разрывом +7 в течение различного времени (1 — 15 с, 2 — 45 с, 3 — 90 с, 4 — 3 мин, 5 — 6 мин, 6 — 10 мин, 7 — 20 мин). Реакция проводилась при концентрации КСl 150 мМ. Сигнал радиоактивного распада [ $^{32}$ P] в меченых РНК-продуктах, разделенных ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях. М — pBR322 *MspI*. Для удобства интерпретации справа приведена схема нуклеосомной матрицы с соблюдением расположения октамера гистонов, положения разрыва и остановки. Стрелкой указано направление транскрипции, треугольником-стрелкой указан участок, при прохождении которого наблюдается замедление РНК-полимеразы в присутствии разрыва +7. **Б** — доля остановленной в положении +24 РНК-полимеразы определена относительно общего количества продуктов транскрипции в нуклеосомной области. Анализ проведен по трем независимым экспериментам. Данные для разрыва +12 взяты из [8] для сравнения. **В** — модель действия однонитевых разрывов +7, +12 и +17. Их положение позади РНКП стимулирует остановку фермента (+24), «сила» которой зависит от расположения разрывов +7, +12 и +17 во внутринуклеосомной петле. При отворачивании ДНК от октамера гистонов позади фермента транскрипция может продолжаться.

ден сравнительный анализ доли комплексов с остановленной в положении +24 РНКП относительно общего числа продуктов транскрипции в нуклеосомной области в присутствии разрывов +7 и +12 (рис. 2Б). Определено, что скорость выхода РНКП из остановленного состояния заметно выше в случае разрыва +7, чем в случае +12. Стабилизация цепей ДНК внутри РНКП или вблизи ДНК-гистоновых взаимодействий, предположительно, способствует более успешному накоплению напряжения в ДНК, открыванию петли и дальнейшему продвижению фермента (рис. 2В).

**Разрыв +7 снижает эффективность остановки РНКП в области +1.** При пониженной ионной силе (40 мМ КСl) наблюдается замедление РНКП на границе нуклеосомы (рис. 1Д, дорожка 3, участок +1). В этом участке через 2 мин реакции накапливается  $14,3 \pm 1,4\%$  РНКП. Разрыв +7 при низкой ионной силе раствора несколько ослабляет остановку РНКП в положении +1 (рис. 1Д, дорожка 7) — доля комплексов составляет  $6,3 \pm 0,3\%$ . Это подтверждает более ранние наши данные о стимулирующем действии разрывов нематричной цепи ДНК на элонгацию, осуществляемую РНКП, через специфичные для транскрипции нуклеосомной ДНК области замедления РНКП, расположенные до повреждения [8]. Предположительно, такой эффект связан с уменьшением положительного суперскручивания ДНК, которое возникает впереди РНКП при транскрипции и негативно сказывается на скорости продвижения фермента [20, 21].

Наши данные подтверждают предложенную ранее модель остановки РНКП в присутствии разрывов, расположенных на нематричной цепи ДНК. По мере продвижения фермента вдоль нуклеосомы происходит отворачивание ДНК от октамера гистонов, и его ДНК-связывающая поверхность открывается. В некоторых положениях РНКП (с периодичностью около 10 п.н.), по-видимому, может происходить кратковременное взаимодействие гистонов и ДНК позади фермента (на расстоянии около 20 п.н. от активного центра). В этом случае формируются временные комплексы, содержащие внутринуклеосомную петлю ДНК с остановленной РНКП. Такие структуры, вероятно, имеют небольшой размер (40–60 п.н.) и эффективно стабилизируются разрывами позади фермента. Остановка РНКП, в свою очередь, может служить сигналом для начала репарации поврежденной ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-44-02013). Работа доктора М.С. Ахтара поддержана Департаментом науки и технологии Индии (грант № DST/INT/RUS/RSF/P27). Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tubbs A., Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer // *Cell*. 2017. Vol. 168. N 4. P. 644–656.
2. Caldecott K.W. DNA single-strand break repair and human genetic disease // *Trends Cell Biol.* 2022. Vol. 32. N 9. P. 733–745.
3. McKinnon P.J., Caldecott K.W. DNA strand break repair and human genetic disease // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2007. Vol. 8. P. 37–55.
4. Zhou W., Doetsch P.W. Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. Vol. 90. N 14. P. 6601–6605.
5. Kathe S.D., Shen G.P., Wallace S.S. Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 18. P. 18511–18520.
6. Neil A.J., Belotserkovskii B.P., Hanawalt P.C. Transcription blockage by bulky end termini at single-strand breaks in the DNA template: differential effects of 5' and 3' adducts // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51. N 44. P. 8964–8970.
7. Li S., Smerdon M.J. Dissecting transcription-coupled and global genomic repair in the chromatin of yeast GAL1-10 genes // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 14. P. 14418–14426.
8. Pestov N.A., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage // *Sci. Adv.* 2015. Vol. 1. N 6: e1500021.
9. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.
10. Hartzog G.A., Speer J.L., Lindstrom D.L. Transcript elongation on a nucleoprotein template // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. Vol. 1577. N 2. P. 276–286.
11. Gerasimova N.S., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Clark D.J., Studitsky V.M. Transcription-induced DNA supercoiling: New roles of intranucleosomal DNA loops in DNA repair and transcription // *Transcription*. 2016. Vol. 7. N 3. P. 91–95.
12. Lowary P.T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 276. N 1. P. 19–42.
13. Artsimovitch I., Svetlov V., Murakami K.S., Landick R. Co-overexpression of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits allows isolation and analysis of mutant enzymes lacking lineage-specific sequence insertions // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 14. P. 12344–12355.
14. Thastrom A., Lowary P.T., Widlund H.R., Cao H., Kubista M., Widom J. Sequence motifs and free energies of

selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 288. N 2. P. 213–229.

15. Bondarenko V.A., Steele L.M., Ujvari A., Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Polikanov Y.S., Luse D.S., Studitsky V.M. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II // *Mol. Cell.* 2006. Vol. 24. N 3. P. 469–479.

16. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J., Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N 3. P. 1619–1627.

17. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.

18. Walter W., Kireeva M.L., Studitsky V.M., Kashlev M. Bacterial polymerase and yeast polymerase II use similar

mechanisms for transcription through nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 38. P. 36148–36156.

19. Ausio J., Seger D., Eisenberg H. Nucleosome core particle stability and conformational change. Effect of temperature, particle and NaCl concentrations, and crosslinking of histone H3 sulfhydryl groups // *J. Mol. Biol.* 1984. Vol. 176. N 1. P. 77–104.

20. Bancaud A., Wagner G., Conde E.S.N., Lavelle C., Wong H., Mozziconacci J., Barbi M., Sivolob A., Le Cam E., Mouawad L., Viovy J.L., Victor J.M., Prunell A. Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers // *Mol. Cell.* 2007. Vol. 27. N 1. P. 135–147.

21. Lilley D.M. DNA opens up – supercoiling and heavy breathing // *Trends Genet.* 1988. Vol. 4. N 4. P. 111–114.

Поступила в редакцию 01.08.2022

После доработки 24.10.2022

Принята в печать 16.11.2022

## RESEARCH ARTICLE

# Effect of single-strand DNA breaks on transcription of nucleosomes

N.S. Gerasimova<sup>1,\*</sup> , M.S. Akhtar<sup>2</sup>, V.M. Studitsky<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup>Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Molecular and Structural Biology Division, CSIR-Central Drug Research Institute, Lucknow 226031, Uttar Pradesh, India;

<sup>3</sup>Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

\*e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Previous studies revealed the inhibitory effect of single-stranded breaks in a non-template DNA strand (NT-SSB) on RNA polymerase transcription through the nucleosome. The observed effect was explained within the model of chromatin transcription mechanism with the formation of intranucleosomal DNA loops (i-loops) – intermediates in which the enzyme is locked in the DNA loop on the histone octamer. According to the model, NT-SSBs reduce the tension in the DNA structure caused by transcription and hinders the opening of the i-loop with the enzyme and further elongation. In this work, the boundaries of such i-loops are determined. Nucleosomes with NT-SSBs were transcribed. It was determined that the formation of contacts between DNA and histones behind RNAP occurs at a distance of more than 17 base pairs from the active center of the enzyme.

**Keywords:** transcription, chromatin, nucleosome, i-loop, Pol 2, DNA repair, single-stranded breaks

**Funding:** The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-44-02013. Work of Dr. Md Sohail Akhtar was funded by № DST/INT/RUS/RSF/P27. Part of the research was performed using facilities of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University «Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology».

## Сведения об авторах

Герасимова Надежда Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5048-0378>

Ахтар Мохаммад Сохаил – PhD, вед. науч. сотр. Центрального Института исследований лекарств Индии, Индия. Тел.: +91-522-277-2450; e-mail: sohail@cdri.res.in

Студитский Василий Михайлович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, профессор Программы эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, штат Филадельфия 19111-2497, США. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.38+577.215.3+616.36-004

**Уровень экспрессии мРНК CXCL12 как независимый маркер прогрессирования фиброза печени у крыс****Е.И. Лебедева<sup>1,\*</sup> , А.С. Бабенко<sup>2</sup> , А.Т. Щастный<sup>1</sup> **<sup>1</sup>*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27;*<sup>2</sup>*Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр. Дзержинского, д. 83, корп. 15**\*e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru*

К настоящему времени накопленные знания о роли хемокина CXCL12 в инициации и развитии фиброза печени немногочисленны и не позволяют оценить потенциал использования уровня мРНК CXCL12 в качестве независимого маркера фиброгенеза и процессов, связанных с фиброзом и циррозом. При моделировании тиаоацетамидом фиброза и цирроза печени у крыс-самцов Wistar на всех стадиях прогрессирования фиброза установлен низкий уровень экспрессии мРНК CXCL12 ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с контрольной группой крыс. В начале эксперимента (3 нед.) выявили интенсивное снижение уровня экспрессии мРНК CXCL12 в 2,93 раза ( $p < 0,0001$ ). С 3 по 9 нед. уровень экспрессии гена снижался постепенно ( $p < 0,0001$ ). Перестройка паренхимы органа и формирование ложных печеночных узелков (11, 13 и 15 нед.) не сопровождалось изменением уровня экспрессии гена. При тотальном формировании ложных печеночных узелков и выраженном диффузном разрастании соединительной ткани (17 нед.) отмечался незначительный рост уровня экспрессии мРНК CXCL12. Полученные нами результаты позволяют предположить, что уровень экспрессии мРНК CXCL12 связан с процессами фиброза и цирроза. мРНК CXCL12 может выступать в роли независимого маркера фиброгенеза, но не цирроза печени на фоне токсического повреждения ее тиаоацетамидом. При проведении фундаментальных, доклинических исследований по оценке эффективности антифибротических лекарственных средств с использованием данной экспериментальной модели и динамики патологического процесса минимально допустимым числом контрольных точек считаем три, а именно: портальный фиброз (3 нед.), мостовидный фиброз (5 нед.), начало процесса трансформации фиброза печени в цирроз (9 нед.).

**Ключевые слова:** фиброз печени, цирроз печени, интоксикация тиаоацетамидом, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, уровень экспрессии мРНК CXCL12, шкала Ishak K.G.

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-248-257

Хемокин CXCL12 конститутивно экспрессируется во многих тканях человека и животных [1]. Посредством связывания с рецептором (CXCR4) CXCL12 активирует много сигнальных путей, которые отвечают за хемотаксис, миграцию клеток, их адгезию, пролиферацию и др. [2]. Большое количество работ посвящено изучению роли и механизмов действия CXCL12 на примере канцерогенеза. Комплексы CXCL12/CXCR4 и CXCL12/CXCR7 являются мишенями для специфических ингибиторов в ходе таргетной терапии ряда опухолей [3]. Одной из главных ролей CXCL12 в развитии опухоли является стимуляция миграции ряда клеток. Однако на данный момент раскрыть достаточное количество деталей механизмов работы CXCL12 не удалось [4].

Значительно меньше работ посвящено роли CXCL12 в инициации и развитии фиброза в раз-

личных органах. Некоторые авторы считают, что в ходе фиброза CXCL12 не только выполняет важную функцию, но и должен рассматриваться как мишень для таргетной терапии фиброза. Это связано с тем, что по аналогии с опухолями, при фиброзе CXCL12 стимулирует миграцию ряда клеток, способствуя его инициации и прогрессированию [5]. Ранее проведенные исследования показали, что ингибирование CXCL12 само по себе пока не оправдывает надежд в отношении терапии фиброза. Напротив, ингибирование его рецептора CXCR4 демонстрирует выраженный терапевтический эффект [6]. Наряду с этим некоторые исследования показывают, что тяжесть и скорость развития фиброза может зависеть от наличия однонуклеотидных замен в структуре гена CXCL12 [7]. Наконец, не стоит упускать из вида и наличие ряда альтернативных сплайс-

вариантов мРНК и изоформ собственно белка *CXCL12*. По мнению некоторых авторов, регуляция экспрессии *CXCL12* осуществляется преимущественно на уровне сплайсинга, а не транскрипции. Различные сплайс-варианты связываются с рецепторами *CXCR4* и *CXCR7*, но характеризуются разными свойствами [8].

К сожалению, даже при наличии всего арсенала современных методов, пока не представляется возможным разобраться в механизмах того или иного патологического процесса в печени методом *in vivo*. Использование клеточных моделей не позволяет воспроизвести постоянно меняющееся состояние микроокружения в печени. Это, в свою очередь, приводит к накоплению противоречивых результатов. В отношении роли *CXCL12* в инициации и развитии фиброза печени также существует ряд вопросов. В частности, первые данные свидетельствовали о том, что уровень белка и мРНК при фиброзе увеличивается и связан с его прогрессированием. Однако позже были получены результаты, согласно которым в зависимости от выбранной модели уровни белка *CXCL12* и мРНК *CXCL12* могут как расти, так и уменьшаться [9].

В изученной литературе отсутствуют исследования, направленные на возможность использования мРНК *CXCL12* как независимого маркера фиброгенеза печени и процессов, связанных с фиброзом и циррозом. Мы не нашли данных об использовании уровня экспрессии мРНК гена для определения направленности процесса в сторону регенерации органа или в сторону прогрессирования фиброза.

В данной работе мы оценивали потенциал использования уровня экспрессии мРНК *CXCL12* в качестве независимого маркера фиброгенеза печени.

### Материалы и методы

В рамках настоящей работы были использованы международные термины по цитологии и гистологии [10], а при описании генов применяли названия терминов, принятые в Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>).

Протокол исследования на крыс-самцах Wistar весом от 190–210 г. был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019). Фиброз и цирроз печени вызывали путем хронической интоксикации крыс тиаоацетамидом (ТАА). В литературе распространена модель внутрибрюшинного введения ТАА в дозе 300 мг/кг 3 раза в нед. Применение данной методики оказалось невозможным

ввиду образования воспаления в местах инъекции раствора и массовой гибели крыс от острой печеночной недостаточности. В связи с этим использовали отработанную опытным путем другую схему эксперимента. Свежеприготовленный раствор ТАА вводили в желудок с помощью зонда (интрагастрально) в дозе 200 мг/кг массы тела крысы 2 раза в нед. в течение 17 нед. Крысы контрольной группы получали аналогичный объем воды без ТАА. Во время эксперимента летальность составила 9 животных (на 2-й, 9-й, 12-й и 15-й нед.). Распределение животных по группам представлено в табл. 1.

Таблица 1

Количество и распределение по группам крыс Wistar в эксперименте

| Наименование группы | Продолжительность эксперимента, недели | Количество крыс в группе |
|---------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| m0<br>контрольная   | 17                                     | 12                       |
| m1                  | 3                                      | 12                       |
| m2                  | 5                                      | 12                       |
| m3                  | 7                                      | 12                       |
| m4                  | 9                                      | 12                       |
| m5                  | 11                                     | 12                       |
| m6                  | 13                                     | 12                       |
| m7                  | 15                                     | 12                       |
| m8                  | 17                                     | 12                       |

**Забор биологического материала и пробоподготовка.** После декапитации из большой левой доли печени крыс скальпелем забирали фрагменты органа диаметром не более 5 мм, помещали в криобирки и далее в жидкий азот для транспортировки и хранения непосредственно до начала процедуры выделения суммарной РНК. Гомогенизацию материала осуществляли с использованием фарфоровых ступок и пестиков в присутствии жидкого азота, не допуская размораживания ткани.

**Выделение суммарной РНК.** Выделение суммарной РНК из исследуемых образцов печени проводили с помощью набора реагентов «АртРНК MiniSpin» (АртБиоТех, Беларусь) согласно протоколу производителя. После процедуры выделения и очистки суммарную РНК элюировали с мини-колонок с помощью свободной от РНКаз воды milli-Q, входящей в состав набора. Контроль качественных характеристик образцов выполняли с помощью электрофореза в агарозном геле (выборочно) без денатурирующих условий (однократный ТРИС-ацетатный буфер, двухпроцентный агарозный гель). Количество суммарной РНК после выделения определяли с помощью спектрофотометрии при длине волны 260 нм на приборе Specord 250 (Analytic Jena, Германия).

**Обратная транскрипция.** Синтез кДНК проводили с использованием олиго-dT праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (АртБиоТех,

Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. Для одной реакции применяли одинаковое стартовое количество суммарной РНК – 200 нг/реакцию.

**Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).** При выполнении ПЦР-РВ использовали реагенты производства компании «Праймтех», Беларусь. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях и количествах: 2 мМ хлорида магния, 0,1 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1,25 ед. термостабильной Таq-ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором. Режим термоциклирования: +95°C – 2 мин, затем 40 циклов: +95°C – 5 сек, +60°C – 45 сек. В работе использовали прибор CFX96touch (BioRad, США). Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений концентрированных образцов кДНК с шагом в 5 раз. Критерием удовлетворительной эффективности считали не менее 95%. Все реакции проводили в трех повторностях. Для оценки относительного уровня мРНК CXCL12 использовали метод 2<sup>-dCt</sup>.

**Олигонуклеотиды.** Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Уникальность и специфичность полученных олигонуклеотидов проверяли с помощью онлайн-сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Перечень выбранных молекулярных мишеней и кандидатов в референсные гены представлен в табл. 2.

В случае наличия нескольких вариантов мРНК перед началом дизайна проводили их выравнивание с помощью бесплатного программного пакета Ugene v.33 (UniPro, Россия). Для дизайна использовали консервативные участки последовательности мРНК (позволяющие анализировать все известные альтернативные сплайс-формы мРНК суммарно) с соблюдением правила о размещении одного или более олигонуклеотидов в месте соединения двух разных экзонов. Последовательности выбранных олигонуклеотидных праймеров и зондов представлены в табл. 3.

**Нормализация данных ПЦР-РВ.** В качестве референсного гена для нормализации данных ПЦР-РВ использовали HES1, характеризующийся наименьшим разбросом значений во всех экспериментальных группах. В предварительном исследовании

Таблица 2

| Характеристика гена-мишени и кандидатов в референсные гены |                             |              |                                     |                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Название гена                                              | Статус                      | NCBI Gene ID | Референсная последовательность мРНК | Кодируемый белок                                                                                                                             |
| CXCL12                                                     | мишень                      | 24772        | NM_001033883.1                      | Хемокин подсемейства CXC                                                                                                                     |
| HPRT1                                                      | кандидат в референсные гены | 24465        | NM_012583.2                         | Гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)                                                         |
| SDHA                                                       | кандидат в референсные гены | 157074       | NM_130428.1                         | Субъединица А флавопротеина, входящего в комплекс сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза (succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A) |
| HES1*                                                      | кандидат в референсные гены | 29577        | NM_024360.4                         | Базовая спираль–петля–спираль 1 семейства bHLH ((basic helix-loop-helix), hes family bHLH transcription factor 1)                            |

Примечание: \* – ген HES1 использован в качестве кандидата в референсные гены поскольку в предварительных экспериментах мы установили высокий уровень стабильности экспрессии (стандартное отклонение менее одного цикла), первоначально рассматривался как ген-мишень.

Таблица 3

Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов

| Ген    | Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3' |                                  |
|--------|---------------------------------------------|----------------------------------|
| CXCL12 | Прямой                                      | CAGATTGTTGCAAGGCTGAA             |
|        | Обратный                                    | TCCACTTTAATTTTCGGGTCAA           |
|        | Зонд                                        | FAM-AAGCAACAACAGACAAGTGTGCA-BHQ1 |
| HPRT1  | Прямой                                      | GGACAGGACTGAAAGACTTGCT           |
|        | Обратный                                    | ACAGAGGGCCACAATGTGAT             |
|        | Зонд                                        | FAM-CATGAAGGAGATGGGAGGCC-BHQ1    |
| SDHA   | Прямой                                      | CCCACAGGTATCTATGGTGCT            |
|        | Обратный                                    | TGGCTGTTGATGAGAATGC              |
|        | Зонд                                        | FAM-CATCACAAGAAGGTGCCGTG-BHQ1    |
| HES1   | Прямой                                      | GAAAGATAGCTCCCGGCATT             |
|        | Обратный                                    | CGGAGGTGCTTCACTGTTCAT            |
|        | Зонд                                        | FAM-CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA-BHQ1   |

довании (данные не приводятся) не обнаружили изменений уровня экспрессии мРНК этого гена в ответ на экспериментальное воздействие в течение всего периода наблюдений (17 нед.). Использование SDHA и HPRT1, а также их комбинации не повышало точность оценки и не вносило принципиальных изменений в конечные расчеты.

**Гистологическое исследование.** Образцы печени диаметром 5–10 мм помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем проводили обработку фиксированного материала с последующей заливкой в парафин с использованием автомата для гистологической обработки ткани STP-120 (Thermo Fisher Scientific, Германия) и станции для заливки ткани парафином EC350 (Thermo Fisher Scientific, Германия). С помощью ротационного микротомы HM340E (MICROM Laborgerate GmbH, Германия) изготавливали 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стекла. Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – по методу Маллори в автоматическом программируемом приборе для цитологических и гистологических исследований HMS70 (Thermo Fisher Scientific, Германия). При выборе метода окраски соединительной ткани в печени остановились на окраске по методу Маллори, используемой в нашей лаборатории.

**Морфометрический анализ.** На гистологических препаратах с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard определяли отношение площади соединительной ткани (в процентах) к общей площади среза [11]. Измерения осуществляли путем микрофото съемки случайных полей зрения препаратов печени цифровой камерой OLYMPUS XC30 (Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении объектива 20× (не менее 3 полей зрения в каждом гистологическом срезе). Степень фиброза печени определяли согласно полуколичественной шкале К.Г. Ишака (табл. 4) [12].

**Статистический анализ.** Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc. США), IBM SPSS Statistics 23.0 (An IBM Company, 28.0.1, США), Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., США).

В выборках для каждой недели эксперимента определяли нормальность частотного распределения признака по критерию Лиллиефорса. Получали описательные статистики и описывали количественные экспериментальные данные в виде средних и их соответствующих доверительных интервалов ДИ (среднее – М (95% ДИ: j-q)), медианы и значения 15-го – 85-го процентилей (медиана – Me (15%-ный перцентиль; 85%-ный перцентиль)). Об уровне статистической значимости различий изучаемых признаков в группах с нормальным частотным распределением данных судили по t-критерию Стьюдента; в случае отличия выборок от нормального частотного распределения использовали U-критерий Манна-Уитни. Для выявления наличия зависимости и ее силы между изучаемыми признаками использовали непараметрическую ранговую корреляцию Спирмена.

Для наглядности результаты статистической обработки данных представили в виде графиков однофакторного параметрического дисперсионного анализа. Так как во всех группах было одинаковое количество исследуемых признаков, считали допустимым использовать параметрический дисперсионный анализ [13].

Результаты

**Морфологический анализ печени крыс.** В печени интактных крыс соединительная ткань выявлялась в незначительном количестве вокруг сосудов триад, центральных и собирательных вен в виде тонких коллагеновых волокон (рис. 1А). Степень фиброза по шкале К.Г. Ишака соответствовала F0.

На раннем сроке эксперимента (3 нед.) отмечался портальный фиброз печени F1. Мостовидный фиброз не выявили.

Таблица 4

Стадии фиброза печени по шкале К.Г. Ишака

| Стадии фиброза по шкале К.Г. Ишака | Морфологическая характеристика степени выраженности фиброза                                                             |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F0                                 | Фиброз отсутствует                                                                                                      |
| F1                                 | Фиброзное расширение портальных зон с короткими фиброзными септами и без них                                            |
| F2                                 | Фиброзное расширение большинства портальных зон с короткими фиброзными септами и без них                                |
| F3                                 | Фиброзное расширение большинства портальных зон с единичными мостовидными портопортальными септами                      |
| F4                                 | Фиброзное расширение большинства портальных зон с выраженными мостовидными портопортальными и портоцентральными септами |
| F5                                 | Многочисленные мостовидные септы с единичными узелками (неполный цирроз)                                                |
| F6                                 | Цирроз достоверный                                                                                                      |

По истечении 5–7 нед. интоксикации крыс ТАА в паренхиме печени обнаружили порталный, мостовидный, местами центрлобулярный и диффузный перичеселлюлярный, фиброз F2/F3 и F3/F4 соответственно (рис. 1Б).

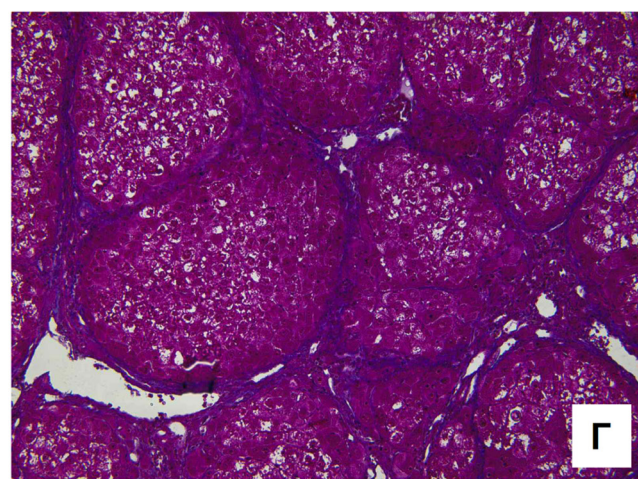
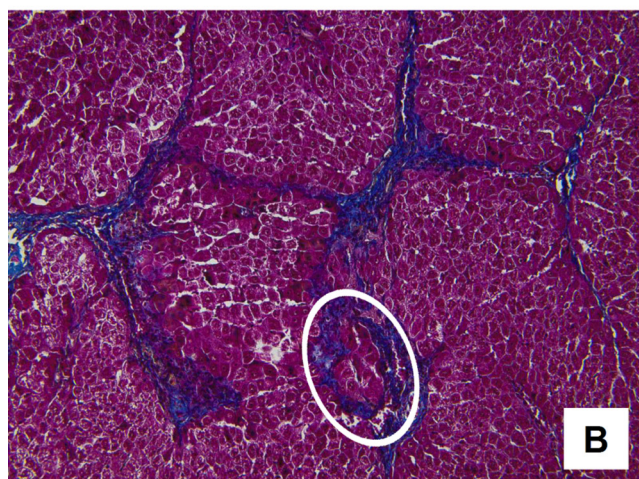
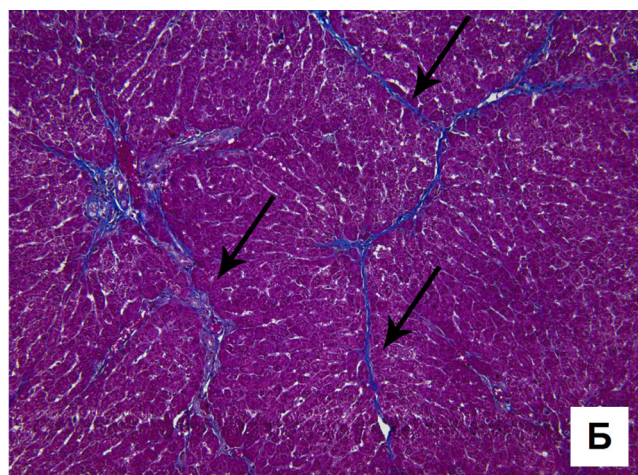
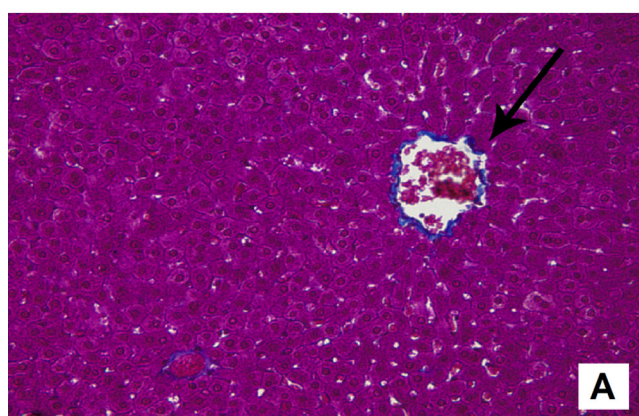
При дальнейшей интоксикации крыс и прогрессировании фиброза печени (9 нед., F4/F5) в гистологических препаратах в области отдельных порталных зон наблюдали единичные ложные печеночные дольки, формирование которых отражает начало процесса трансформации фиброза печени в цирроз (рис. 1В).

По окончании 11 нед. эксперимента на гистологических препаратах выявили диффузную перестройку паренхимы печени с формированием ложных печеночных долек, что соответствовало степени фиброза F5. Интересно отметить, что в период с 9-й по 11-ю нед. в печени крыс не наблюдали процесс увеличения зон некроза на местах полей вакуольной дистрофии и некробиоза гепатоцитов. При этом установили значительное

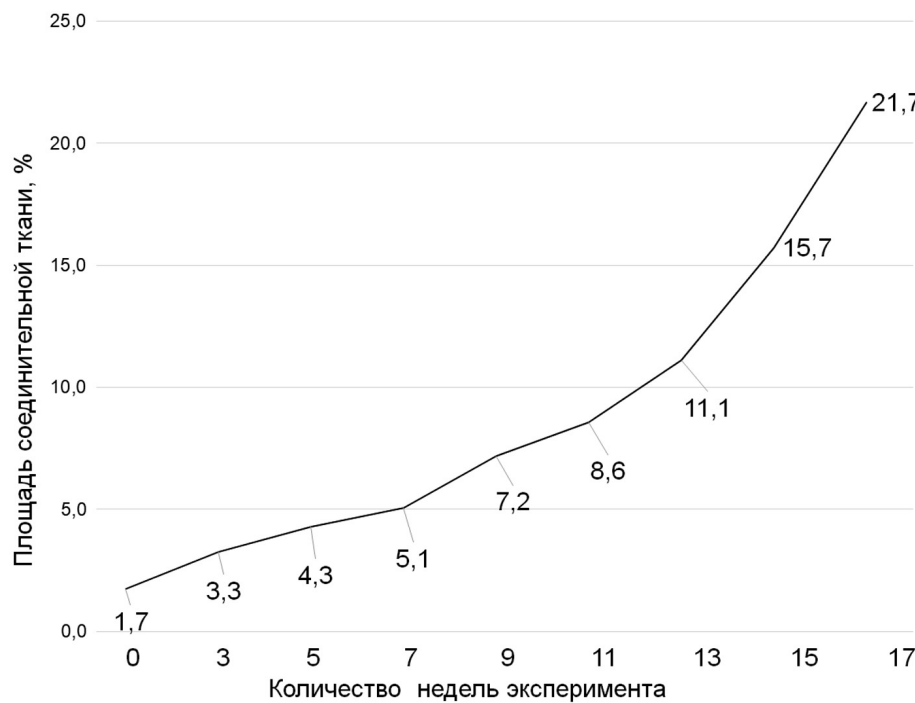
разрастание соединительной ткани вокруг порталных зон и формирование толстых соединительнотканых септ по периферии ложных печеночных долек.

На следующем этапе эксперимента (13 нед.) морфологически выявили тотальное поражение печени крыс (достоверный цирроз, F6). На срезах гистологических препаратов отмечали образование ложных печеночных узелков разного диаметра и формы (рис. 1Г).

К концу эксперимента (15–17 нед.) наблюдали выраженное диффузное разрастание соединительнотканых септ, формирование новых ложных печеночных долек за счет разделения крупных долек тонкими соединительноткаными септами, а также выраженный диффузный порталный, перипортальный и перичеселлюлярный фиброз. Установлено, что в различных участках одного и того же среза прогрессирование патологических изменений было выражено с различной степенью интенсивности.



**Рис. 1.** Фрагменты печени крыс. Окраска по методу Маллори. А — фрагмент печени крысы контрольной группы, незначительное количество соединительной ткани в области центральной вены отмечено стрелкой, увел. 400×; Б — фрагмент печени крысы с индуцированным циррозом через 5 нед. после начала эксперимента, соединительнотканые септы между порталными зонами (мостовидный фиброз) отмечены стрелками, увел. 200×; В — фрагмент печени крысы с индуцированным циррозом через 9 нед. после начала эксперимента, сформированная ложная печеночная долька выделена рамкой овальной формы, увел. 200×; Г — фрагмент печени крысы с индуцированным циррозом через 13 нед. после начала эксперимента, видны сформированные ложные печеночные дольки, увел. 200×.



**Рис. 2.** Изменения площади соединительной ткани в процентах к общей площади гистологического среза при ТАА-индуцированном фиброгенезе печени крыс Wistar

**Изменение площади соединительной ткани.** На рис. 2 представлен график изменения площади соединительной ткани на протяжении всего эксперимента. До стадии фиброза F5 (неполный цирроз, 11 нед.) отмечали процесс постепенного увеличения площади соединительной ткани. Вместе с тем к концу 17 нед. происходило ее интенсивное разрастание и увеличение в 14,00 раз ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с контрольной группой.

Следует обратить внимание на факт того, что при попарном сравнении нед. эксперимента между собой отличий не выявлено: между контрольной группой и 3 нед. ( $p = 0,6759$ ), между 3 и 5 нед. ( $p = 0,9560$ ), между 3 и 7 нед. ( $p = 0,4433$ ), между 5 и 7 нед. ( $p = 0,9936$ ).

**Динамика уровня экспрессии мРНК гена *CXCL12*.** На всех стадиях фиброза и цирроза в печени крыс-самцов Wistar установлен низкий уровень экспрессии мРНК *CXCL12* ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с контрольной группой крыс. Изменение уровня экспрессии гена представлены в табл. 5 и рис. 3. В начале эксперимента (3 нед.) установили резкое снижение уровня экспрессии мРНК *CXCL12* в 2,93 раза ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с контрольной группой.

С 3 по 9 нед. уровень экспрессии гена уменьшался постепенно ( $p < 0,0001$ ). Перестройка паренхимы органа и формирование ложных печеночных узелков (11, 13 и 15 нед.) не сопровождалась изменением уровня экспрессии гена. При тотальном образовании ложных печеночных узелков и выраженном диффузном разрастании соедини-

тельной ткани (17 нед.) происходил незначительный рост уровня экспрессии мРНК *CXCL12*.

Таблица 5

Уровень экспрессии мРНК *CXCL12* в ходе эксперимента

| Группы животных/недели эксперимента | Относительный уровень экспрессии мРНК <i>CXCL12</i> (Ме (15%;85%)) |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| m0/17, контрольная                  | 11,719 (6,062;21,112)                                              |
| m1/3                                | 4,00 (3,138;6,498)                                                 |
| m2/5                                | 2,261 (1,214;4,199)                                                |
| m3/7                                | 1,866 (1,197;3,758)                                                |
| m4/9                                | 0,850 (0,726;0,974)                                                |
| m5/11                               | 0,663 (0,583;0,744)                                                |
| m6/13                               | 0,651 (0,510;0,792)                                                |
| m7/15                               | 0,456 (0,267;0,615)                                                |
| m8/17                               | 0,872 (0,435;2,462)                                                |

Методом непараметрической ранговой корреляции Спирмена между уровнем экспрессии мРНК *CXCL12* и степенью фиброза в двух экспериментальных точках выявлена корреляционная связь: на стадии портального фиброза F1 – прямая умеренной силы ( $r = 0,37$ ,  $p < 0,05$ ) и на стадии мостовидного фиброза F3/F4 – обратная умеренной силы ( $r = -0,36$ ,  $p < 0,05$ ). Силу связи оценивали с использованием коэффициентов общей корреляции [13].

Исследования показали, что с одной стороны наблюдали тенденцию к росту площади соединительной ткани, а с другой – определили снижение уровня экспрессии мРНК *CXCL12*.

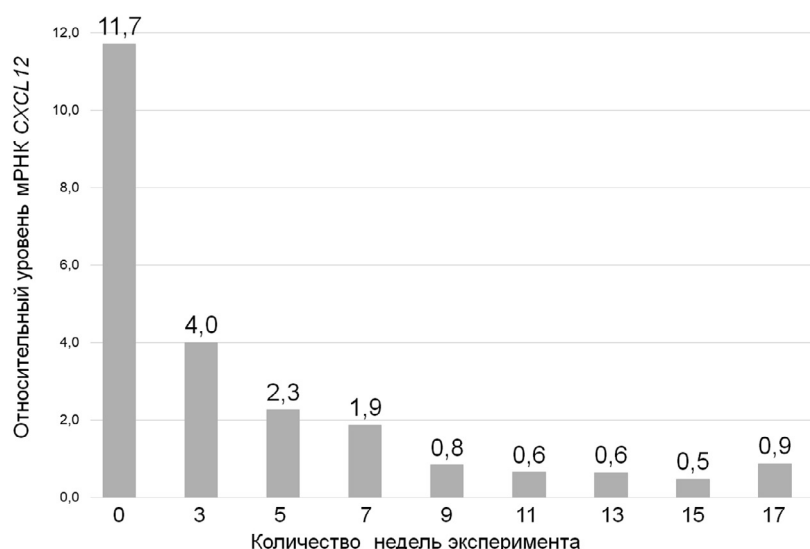


Рис. 3. Изменения относительного уровня мРНК *CXCL12* при ТАА-индуцированном фиброгенезе печени крыс Wistar

### Обсуждение результатов

Анализ литературы выявил существенные пробелы в изучении уровней экспрессии мРНК *CXCL12* и белка *CXCL12* на конкретных стадиях (сроках) фиброза [14, 15]. Выбор экспериментальной модели в настоящем исследовании был обоснован тем, что у лабораторных животных ТАА вызывает поражение печени с морфологическими характеристиками, аналогичными таковым у людей с фиброзом и циррозом печени [16]. Крысы Wistar являются часто используемым объектом при проведении доклинических исследований по оценке эффективности лекарственных средств и их конечного лечебного эффекта. В научной литературе данные, посвященные уровню экспрессии мРНК *CXCL12* с применением такой экспериментальной модели, практически не встречаются.

Особое внимание мы уделяли длительности эксперимента и подробному морфологическому стадированию фиброза по шкале К.Г. Ишака F0-F6. Следует отметить, что в работах, по изучению уровня экспрессии мРНК *CXCL12*, исследователи практически не уделяли внимания нормализации данных ПЦР-РВ. Практически не встречается обоснование выбора референсного гена и лишь в отдельных случаях — отсылки на соблюдение правил MIQE [8, 9, 17]. Это может быть одной из причин получения противоречивых данных о роли *CXCL12* в процессах инициации и развития фибротических изменений.

В наших исследованиях принципиальным направлением являлось использования показателей уровня экспрессии мРНК *CXCL12* в качестве независимого маркера фиброгенеза печени. На всех стадиях прогрессирования фиброза установлен низкий уровень экспрессии мРНК *CXCL12* ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с контрольной группой.

На стадии портального фиброза отмечено резкое снижение уровня экспрессии мРНК *CXCL12* (3 нед.,  $p < 0,0001$ ). Далее до начала трансформации фиброза печени в цирроз (с 3-й по 9-ю нед.) наблюдали его постепенное снижение ( $p < 0,0001$ ). Перестройка паренхимы органа и формирование ложных печеночных узелков (с 11-й по 15-ю нед.) не приводили к изменению уровня экспрессии мРНК *CXCL12*. При этом к концу эксперимента (17 нед.) установили его незначительный рост.

Фиброз и цирроз печени крыс сопровождается миграцией в орган гемопоэтических клеток из костного мозга, капилляризацией синусоидных капилляров, трансдифференцировкой макрофагов в различные субпопуляции, активацией жиронакапливающих клеток в миофибробластический фенотип и индукцией молекулярных каскадов ряда сигнальных путей, находящихся в условиях физиологической нормы в состоянии ингибирования [18–26]. Какие из этих процессов связаны со снижением уровня экспрессии мРНК *CXCL12* предстоит изучить в дальнейшем.

Одной из важных задач исследования стало изучение связи между уровнем экспрессии мРНК *CXCL12* и процессами прогрессирования и регресса фиброза печени. Эта информация может быть чрезвычайно полезна для клинической практики, где оценка динамики патологического процесса во времени на фоне терапии имеет большое значение. Полученные нами данные показали, что оценка уровня экспрессии мРНК *CXCL12* действительно может указать на направленность процесса и косвенно свидетельствовать об успешности или неоправданности используемых терапевтических подходов. Снижение уровня экс-

прессии мРНК является фактором неблагоприятного прогноза при фиброзе. Однако при наступлении цирроза уровень экспрессии мРНК *CXCL12* остается практически неизменным и теряет прогностическую значимость. Таким образом, уровень экспрессии мРНК может быть маркером динамики фиброза, но не цирроза печени на фоне токсического ее повреждения ТАА.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют предположить, что уровень экспрессии мРНК *CXCL12* связан с процессами фиброза/цирроза и может выступать в роли независимого маркера только фиброгенеза, но не цирроза печени на фоне токсического повреждения ее ТАА. При проведении фундаментальных, доклинических исследований по оценке эффективности антифибротических лекарственных средств с использованием данной экспериментальной модели и контроле динамики патологического процесса минимально допустимым числом контрольных точек считаем три, а именно: портальный фиброз (3 нед.), мостовидный фиброз (5 нед.), начало процесса трансформация фиброза печени в цирроз (9 нед.). На данной модели цирроза выбор этих точек мы обосновываем тем, что инициация фиброза начинается вокруг портальных зон. Соединительнотканые септы с тяжами из полиморфных клеток разной степени дифференциров-

ки направлялись через паренхиму от одних портальных зон печени в сторону соседних портальных зон, таким образом обозначая путь для разрастания соединительной ткани.

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки — медицине» Министерства Здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении», № 20190107. Протокол эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019 г). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994—1996). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou W., Guo S., Liu M., Burow M.E., Wang G. Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy // *Curr. Med. Chem.* 2019. Vol. 26. N 17. P. 3026—3041.
2. Dewan M.Z., Ahmed S., Iwasaki Y., Ohba K., Toi M., Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer // *Biomed. Pharmacother.* 2006. Vol. 60. N 6. P. 273—276.
3. Khare T., Bissonnette M., Khare S. CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in colorectal cancer: Therapeutic target in preclinical and clinical studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. N 14: 7371.
4. Ray P., Stacer A.C., Fenner J., Cavnar S.P., Meguiar K., Brown M., Luker K.E., Luker G.D. CXCL12- $\gamma$  in primary tumors drives breast cancer metastasis // *Oncogene*. 2015. Vol. 34. N 16. P. 2043—2051.
5. Qin L., Qin J., Zhen X., Yang Q., Huang L. Curcumin protects against hepatic stellate cells activation and migration by inhibiting the CXCL12/CXCR4 biological axis in liver fibrosis: A study *in vitro* and *in vivo* // *Biomed. Pharmacother.* 2018. Vol. 101. P. 599—607.
6. Cui L.N., Zheng X.H., Yu J.H., Han Y. Role of CXCL12-CXCR4/CXCR7 signal axis in liver regeneration and liver fibrosis // *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2021. Vol. 29. N 9. P. 900—903.
7. Chiraunyanann T., Changsri K., Sretapunya W., Yuenyongchaiwat K., Akekawatchai C. CXCL12 G801A polymorphism is associated with significant liver fibrosis in HIV-infected Thais: a cross-sectional study // *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2019. Vol. 37. N 3. P. 162—170.
8. Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants // *Cell Adh. Migr.* 2009. Vol. 3. N 3. P. 243—249.
9. Korbecki J., Kojder K., Kapczuk P., Kupnicka P., Gawrońska-Szklarz B., Gutowska I., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. The effect of hypoxia on the expression of CXC chemokines and CXC chemokine receptors — A review of literature // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. N 2: 843.
10. Банин В.В., Быков В.Л. (ред.). Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.
11. Guerrier M., Attili F., Alpini G., Glaser S. Prolonged administration of secretin to normal rats increases biliary proliferation and secretin-induced ductal secretory activity // *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2014. Vol. 3. N 3. P. 118—125.
12. Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., et al. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial // *Hepatology*. 2010. Vol. 51. N 2. P. 585—594.
13. Жижин К.С. Медицинская статистика: Учебное пособие. Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. 160 с.
14. Liu Y., Yang X., Jing Y., Zhang S., Zong C., Jiang J., Sun K., Li R., Gao L., Zhao X., Wu D., Shi Y., Han Z., Wei L. Contribution and mobilization of mesenchymal stem cells in a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. N 2: 17762.
15. King A., Houlihan D.D., Kavanagh D., et al. Sphingosine-1-phosphate prevents egress of hematopoietic

stem cells from liver to reduce fibrosis // *Gastroenterology*. 2017. Vol. 153. N 1. P. 233–248.e16.

16. Muthiah M.D., Huang D.Q., Zhou L., Jumat N. H., Choolani M., Chan J.K.Y., Wee A., Lim S.G., Dan Y.Y. A murine model demonstrating reversal of structural and functional correlates of cirrhosis with progenitor cell transplantation // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. N 1: 15446.

17. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // *Clin. Chem.* 2009. Vol. 55. N 4. P. 611–622.

18. Watanabe Y., Tsuchiya A., Seino S., Kawata Y., Kojima Y., Ikarashi S., Starkey Lewis P.J., Lu W.Y., Kikuta J., Kawai H., Yamagiwa S., Forbes S.J., Ishii M., Terai S. Mesenchymal stem cells and induced bone marrow-derived macrophages synergistically improve liver fibrosis in mice stem cells // *Transl. Med.* 2019. Vol. 8. N 3. P. 271–284.

19. Wang J., Sun M., Liu W., Li Y., Li M. Stem cell-based therapies for liver diseases: An overview and update // *Tissue Eng. Regen. Med.* 2019. Vol. 16. N 2. P. 107–118.

20. Griessmair L., Pirringer L., Mountford S., Sendelhofert A., Makeschin M.C., Koletzko S., Mayr D., Bufler P. Expression of IL-37 correlates with immune cell infiltrate and fibrosis in pediatric autoimmune liver diseases // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2022. Vol. 74. N 11. P. 742–749.

21. Ogawa H., Kaji K., Nishimura N., Takagi H., Ishida K., Takaya H., Kawaratani H., Moriya K., Namisaki T.,

Akahane T., Yoshiji H. Lenvatinib prevents liver fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and sinusoidal capillarization in experimental liver fibrosis // *J. Cell. Mol. Med.* 2021. Vol. 25. N 8. P. 4001–4013.

22. Cheng Q., Li C., Yang C.F., Zhong Y.J., Wu D., Shi L., Chen L., Li Y.W., Li L. Methyl ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through the TGF- $\beta$ /Smad and NOX4/ROS pathways // *Chem. Biol. Interact.* 2019. Vol. 299. P. 131–139.

23. Wen Y., Lambrecht J., Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities // *Cell. Mol. Immunol.* 2021. Vol. 18. N 1. P. 45–56.

24. Mu M., Zuo S., Wu R.M., Deng K.S., Lu S., Zhu J.J., Zou G.L., Yang J., Cheng M.L., Zhao X.K. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway // *Drug Des. Devel. Ther.* 2018. Vol. 12. P. 4107–4115.

25. Xiang D., Zou J., Zhu X., Chen X., Luo J., Kong L., Zhang H. Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF- $\beta$ /Smad and YAP signaling // *Phytomedicine*. 2020. Vol. 78: 153294.

26. Ni M.M., Wang Y.R., Wu W.W., Xia C.C., Zhang Y.H., Xu J., Xu T., Li J. Novel insights on Notch signaling pathways in liver fibrosis // *Eur. J. Pharmacol.* 2018. Vol. 826. P. 66–74.

Поступила в редакцию 26.07.2022

После доработки 05.10.2022

Принята в печать 09.11.2022

## RESEARCH ARTICLE

# CXCL12 mRNA expression as an independent marker of liver fibrogenesis in rats

E.I. Lebedeva<sup>1,\*</sup> , A.S. Babenka<sup>2</sup> , A.T. Shchastny<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze Ave.;

<sup>2</sup>Belarussian State Medical University, Republic of Belarus, 220116, Minsk, 83–15 Dzerzhinsky ave.

\*e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

The accumulated knowledge about the role of the CXCL12 chemokine in the initiation and development of liver fibrosis is insignificant and does not allow us to assess the potential of using the CXCL12 mRNA level as an independent marker of fibrogenesis and processes associated with fibrosis and cirrhosis. Thioacetamide modeling of liver fibrosis and cirrhosis in male Wistar rats showed a low level of CXCL12 mRNA expression ( $p = 0.0000$ ) at all stages of fibrosis progression. At the beginning of the experiment (3 weeks), a decrease in the level of CXCL12 mRNA by 2.93 times ( $p = 0.0000$ ) compared with the control group was revealed. After 3, 7 and 9 weeks, the level of gene expression decreased gradually ( $p = 0.0000$ ). During the reorganization of the parenchyma of the organ and the formation of false hepatic nodules (11, 13 and 15 weeks), a certain stabilization of the level of gene expression was noted. Against the background of the total formation of pseudohepatic nodules and a pronounced diffuse proliferation of connective tissue (17 weeks), the level of CXCL12 mRNA expression increased, but did not reach the level of control values. Based on our results, the level of CXCL12 mRNA is associated with the processes of fibrosis/cirrhosis and can act as an independent marker of fibrogenesis, but not cirrhosis of the liver against the background of toxic damage to it by thioacetamide. When conducting fundamental and preclinical studies to evaluate the effectiveness of drugs using this experimental model, the minimum allowable number of control points is considered to be three, namely: portal fibrosis (3 weeks), bridging fibrosis (5 weeks), the beginning of the process of transformation of liver fibrosis into cirrhosis (9 weeks).

**Keywords:** *liver fibrosis and liver cirrhosis, thioacetamide intoxication, real-time polymerase chain reaction, CXCL12 mRNA expression level, scale K.G. Ishak*

**Funding:** The work was carried out within the framework of the state research program “Fundamental and Applied Sciences for Medicine” of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, task 2.89 “To study the role of the expression of NOTCH- and TWEAK-signaling pathway genes involved in the processes of proliferation and differentiation of liver cells in normal conditions and in its toxic defeat”, No. 20190107.

### Сведения об авторах

*Лебедева Елена Ивановна* — канд. биол. наук, доц. кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета. Тел.: +375-212-60-14-29; e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

*Бабенко Андрей Сергеевич* — канд. хим. наук, доц. кафедры биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета. Тел.: + 375-017-279-42-13; e-mail: labmdbt@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

*Щастный Анатолий Тадеушевич* — докт. мед. наук, ректор, зав. кафедрой хирургии ФПК и ПК Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета. Тел.: + 375-212-60-13-95; e-mail: admin@vsmu.by; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.045+58.009

**Влияние климатических факторов на продолжительность цветения видов в Карадагском природном заповеднике****В.Ю. Летухова\* , А.В. Зуев, И.Л. Потапенко***Карадагская научная станция имени Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН,  
Россия, 298188, Крым, Феодосия, Курортное, ул. Науки, д. 24**\*e-mail: letukhova@gmail.com*

Фенологические реакции растений на изменение погодных условий очень сильны и могут служить индикатором глобального изменения климата. Поняв, как отдельные виды реагируют на изменяющиеся условия, можно смоделировать, как изменятся экосистемы в целом. В данной статье анализируется влияние климатических факторов (температуры воздуха и осадков) на продолжительность цветения дикорастущих видов сосудистых растений Карадагского природного заповедника (Крым). Было учтено 152 вида растений с рядом фенологических наблюдений от 5 до 8 лет. Корреляционный анализ между продолжительностью цветения и климатическими факторами выявил высокую зависимость у 89 (58,6%) видов. При этом климатические факторы текущего вегетационного периода оказывали влияние на цветение 71 вида, предыдущего вегетационного периода — на цветение 4 видов, обоих вегетационных периодов — на цветение 14 видов. Температура воздуха и осадки примерно в равной степени оказывают влияние на продолжительность цветения видов. У 35 (41,2%) видов отмечена корреляция между продолжительностью цветения и температурой воздуха; у 32 (37,7%) — между продолжительностью цветения и осадками; у 18 (21,1%) обнаружено влияние обоих параметров. Чаще всего продолжительность цветения отрицательно коррелировала со значениями температуры воздуха и положительно — с количеством осадков. Наиболее чувствительные к климатическим факторам оказались мезофиты и виды, произрастающие в лесных сообществах, наименее чувствительные — эуксерофиты и виды, произрастающие в степных сообществах.

**Ключевые слова:** влияние климата, сосудистые растения, фенология цветения, мониторинг, Карадагский заповедник, Крым

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-258-265

В последние годы проблема изменения климата становится все более актуальной. В отчете Межправительственной группы экспертов по изменению климата сделан вывод о том, что средняя глобальная температура, в зависимости от сценария выбросов парниковых газов, повысится на 1,8–4,0°C. Это будет сопровождаться изменением характера осадков и увеличением изменчивости климата. Ответные реакции организмов, включающие изменения в физиологии, численности популяций, географическом распространении и смещении сезонных сроков развития, часто недостаточны для того, чтобы справиться с подобными трансформациями [1, 2].

Глобальные перемены отражаются на состоянии экосистем. Поняв, как отдельные виды реагируют на изменяющиеся климатические условия, мы сможем смоделировать, как изменятся экосистемы в целом. В частности, фенологические показатели растений (срок и длительность цветения) очень чувствительны к ежегодной изменчивости погоды. Таким образом, они могут служить инди-

катором долгосрочных биологических последствий изменения климата [3–7].

Изменение климата может повлиять на цветение растений, и этот факт имеет большое значение для функционирования экосистем, например, из-за потенциального разделения времени цветения и жизненных циклов опылителей [8, 9]. Продолжительность цветения важна, так как более длительный период цветения может предоставить больше возможностей для размножения растений. Как следствие, репродуктивный успех будет способствовать распространению вида [7, 10, 11]. Поэтому в последние годы фенологические наблюдения вышли из тени и стали основным компонентом исследований изменения климата. Отчасти это связано с тем, что фенологические реакции растений на изменения температуры очень сильны. Важным моментом является то, что фенологические изменения относительно легко идентифицировать, особенно по сравнению с изменениями в распространении, морфологии видов, численности популяций [12].

Мониторинг сезонного развития дикорастущих растений сосредоточен в заповедниках и национальных парках России. Сотрудниками заповедников ведется «Летопись природы» — документ, в который систематически, в течение длительного времени, собираются сведения о динамике природных явлений. Цель данного исследования — определить влияние климатических факторов (температуры воздуха и осадков) на продолжительность цветения видов сосудистых растений Карадагского природного заповедника.

### Материалы и методы

Предметом исследования стали данные «Летописи природы» Карадагского природного заповедника за период с 2012 по 2020 гг. Карадагский горный массив расположен в восточной части Южного берега Крыма в городском округе Феодосия между поселками Коктебель, Шебетовка и Курортное. С 1979 г. его территория охраняется государством: создан Карадагский природный заповедник, который имеет площадь 2065,1 га суши и 809,1 га морской акватории. Наблюдения проводились на территории Карадагского ландшафтно-экологического стационара (КЛЭС), организованного в 1993 г. Он расположен в юго-западной части Карадагского заповедника на юго-восточном склоне хребта Беш-Таш и охватывает территорию водосбора склоновой балки площадью 17 га.

В основу работы положены многолетние фенологические и метеорологические наблюдения, проводимые на КЛЭС. Использованы ряды данных измерений температуры воздуха и количества осадков. Метеорологическая площадка КЛЭС расположена в нижней части водосбора на относительно ровной поверхности (экспозиция СВ, крутизна 5°), в 15 м от тальвега балки на высоте 140 м ниже уровня моря. Рядом с пунктами наблюдения за температурным режимом на открытом степном участке и под лесным пологом установлены сосуды для сбора осадков.

Гидротермический коэффициент Селянинова (ГКС) был рассчитан по следующей формуле:

$$ГКС = \Sigma_r \times 10 / \Sigma_t$$

где  $\Sigma_r$  — сумма осадков (мм) за рассматриваемый период календарного года со среднесуточными температурами выше 10°C;  $\Sigma_t$  — сумма активных температур (САТ) за тот же период календарного года.

С 2013 г. проводился фенологический учет цветущих видов растений. Фиксировали даты наступления и окончания цветения 152 дикорастущих видов, произрастающих на территории КЛЭС в различных растительных сообществах (в петрофитной степи, кустарниковых и лесных сообществах). Наблюдения проводились над популяциями видов. Началом цветения считали день, когда в фазу цветения вступало 5–10% по-

пуляции. Конец цветения отмечался в день отсутствия цветков.

С помощью непараметрического коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ) была определена зависимость между продолжительностью цветения видов и климатическими факторами. Зависимость считалась высокой, если  $r \leq 0,05$ ; заметной (по шкале Чеддока), если  $0,05 < r \leq 0,1$ , и отсутствующей, если  $r > 0,1$ . При изучении влияния температуры было взято несколько параметров: среднегодовая температура, САТ (°C) за период со среднесуточной температурой выше 10°C, среднемесячные температуры на разных стадиях развития растения (месяц бутонизации, месяц начала цветения, месяц конца цветения или два последующих месяца, если продолжительность цветения была больше 30 сут). Продолжительность цветения считали коррелирующей со значениями температуры воздуха, если она коррелировала с одним или несколькими из этих параметров. При изучении влияния осадков были взяты следующие параметры: сумма осадков за год; количество осадков в месяц начала цветения вида; в месяц, предшествующий цветению (в фазу бутонизации); в месяц, следующий за началом цветения вида, или два последующих месяца, если продолжительность цветения больше 30 сут. Продолжительность цветения считали коррелирующей с осадками, если она коррелировала с одним или несколькими из этих параметров. Также было проанализировано влияние ГКС на продолжительность цветения. При анализе предыдущего вегетационного периода учитывались только САТ (°C) за период со среднесуточной температурой выше 10°C, количество осадков (мм) за период выше 10°C и ГКС предыдущего вегетационного периода. Учитывали виды с рядом фенологических наблюдений от 5 до 8 лет. Статистические расчеты проводили в программе R версии 4.1.0.

Номенклатура таксонов приведена по С.К. Черепанову [13]. Биоморфологическую и экологическую характеристику флористических групп осуществляли с использованием данных «Биологической флоры Крыма» В.Н. Голубева [14].

### Результаты

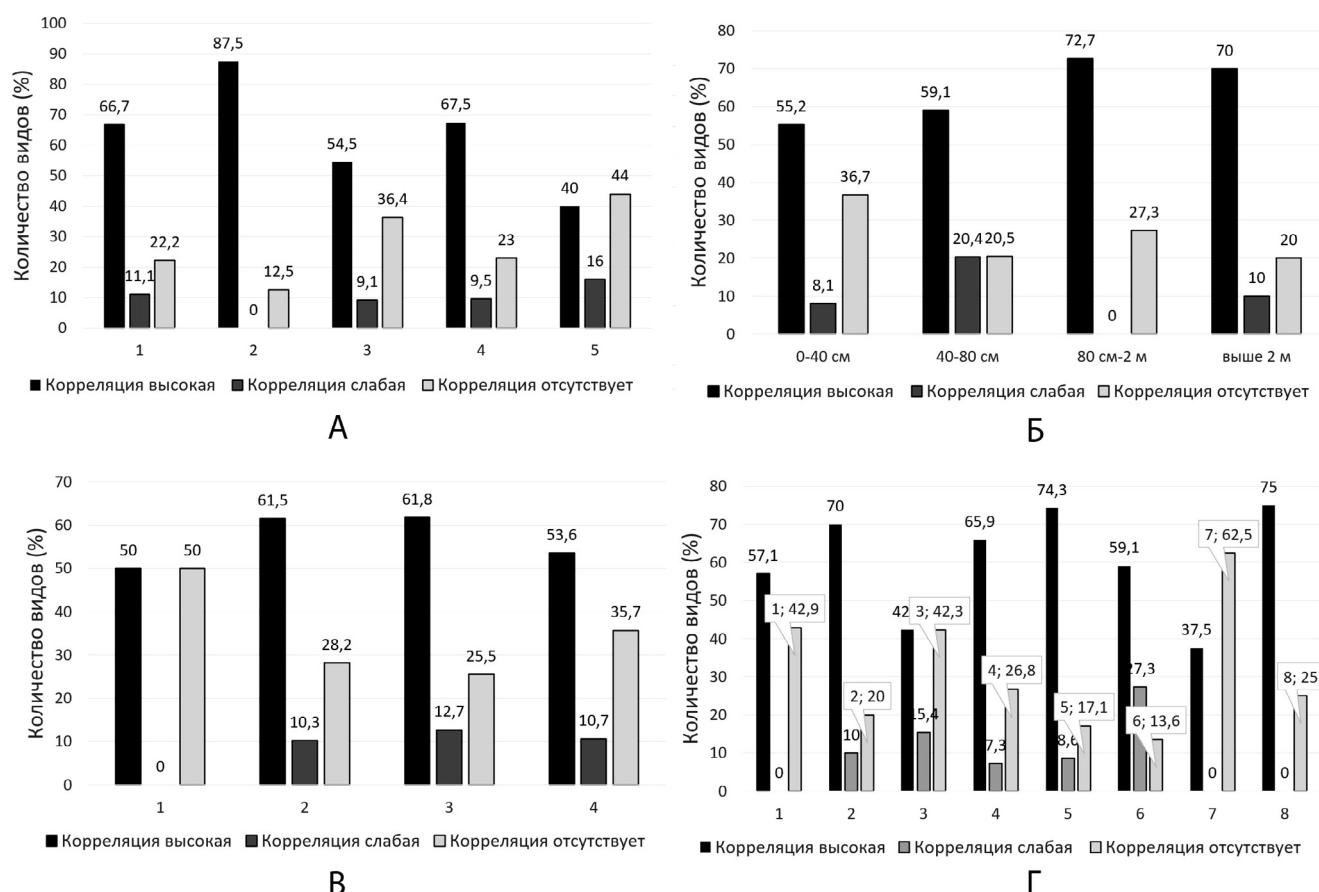
Для фенологических наблюдений было отобрано 152 вида растений. Из них: 74 (48,7%) относились к поликарпическим травам или многолетним монокарпикам; 50 (32,9%) — к однолетникам или двухлетникам; 11 (7,2%) — к полукустарникам или полукустарничкам; 9 (5,9%) — к деревьям и 8 (5,3%) — к кустарникам и кустарничкам. Состав видов по вегетации оказался следующим: 56 (36,8%) — эфемеры и эфемероиды; 55 (36,2%) — летнезеленые; 39 (25,7%) — летнезеленые и 2 (1,3%) — собственно вечнозеленые. По классу высоты побегов виды распределились следующим

образом: 87 (57,2%) имели высоту побегов до 40 см; 44 (28,9%) имели высоту побега от 40 до 80 см; 11 (7,2%) имели высоту побега от 80 см до 2 м и 10 (6,6%) имели побеги выше 2 м. По ритму цветения распределение видов было следующее: 14 (9,2%) – позднезимние и ранне-средневесенние; 11 (7,2%) – весенние; 26 (17,1%) – средне-поздневесенние; 41 (27%) – поздневесенние-раннелетние; 26 (17,1%) – ранне-среднелетние; 22 (14,5%) – летние; 8 (5,3%) – средне-позднелетние и 4 (2,6%) – позднелетне-осенние. Кроме того, изученные виды произрастали в следующих растительных сообществах: 88 (57,9%) – в кустарниковом сообществе; 42 (27,6%) – в петрофитной степи и 22 (14,5%) – в лесном сообществе.

Продолжительность цветения коррелировала с климатическими факторами у 89 (58,6%) видов растений. При этом климатические факторы текущего вегетационного периода оказывали влияние на цветение 71 вида, предыдущего вегетационного периода – на цветение 4 видов, обоих вегетационных периодов – на цветение 14 видов. Корреляция была заметной у 17 (11,2%) видов растений, и корреляция отсутствовала у 46 (30,2%) видов. Более всего подвержено влиянию климатических

факторов цветение деревьев и кустарников. В этой группе растений высокая корреляция наблюдалась соответственно у 66,7% и 88,5% видов (рис. 1А). Менее всего климатические факторы влияют на цветение двухлетников и однолетников (корреляция высокая – у 40%; корреляция отсутствует – у 44% видов). Такой же результат показал анализ видов по классу высоты побегов: чем выше растения, тем выше доля видов с высокой корреляцией (рис. 1Б).

Среди видов с различной биоморфой по вегетации более всего подвержено влиянию климата цветение летнезеленых и летне-зимнезеленых растений (высокая корреляция в этой группе наблюдалась у 61,5% и 61,8% соответственно). Хуже всего цветение коррелировало с климатическими факторами у эфемеров и эфемероидов: корреляция была высокой у 53,6% видов и корреляция отсутствовала у 35,7% видов (рис. 1В). Также климатические факторы по-разному влияют на виды, цветущие в разный период (рис. 1Г). Менее всего влиянию подвержены средне-позднелетние виды: в этой группе растений высокая корреляция отмечена у 37,5% видов, корреляция отсутствовала у 62,5% видов.



**Рис. 1.** Влияние климатических факторов на продолжительность цветения различных биоморф. А. Основные биоморфы: 1 – деревья; 2 – кустарники и кустарнички; 3 – полукустарники и полукустарнички; 4 – поликарпические травы или многолетние монокарпики; 5 – двухлетники, озимые или яровые однолетники. Б. Биоморфы по классу высоты побегов. В. Биоморфы по вегетации: 1 – собственно вечнозеленые; 2 – летнезеленые; 3 – летнее-зимнезеленые; 4 – эфемеры и эфемероиды. Г. Биоморфы по ритму цветения: 1 – позднезимние и ранне-средневесенние; 2 – весенние; 3 – средне-поздневесенние; 4 – поздневесенние-раннелетние; 5 – ранне-среднелетние; 6 – летние; 7 – средне-позднелетние; 8 – позднелетне-осенние.

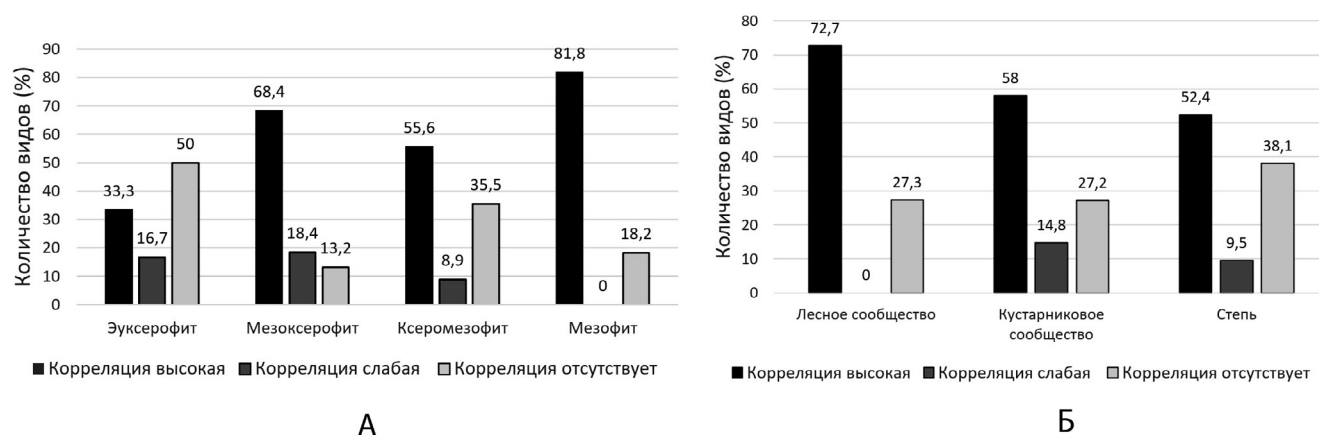


Рис. 2. Влияние климатических факторов на продолжительность цветения различных экоморф (А) и ценоморф (Б).

В категории видов с различной экоморфой по водному режиму больше всего климатические факторы влияли на цветение мезофитов (высокая корреляция отмечена у 81,8% видов). Менее всего влиянию подвержены эуксерофиты: высокая корреляция отмечена у 33,3% видов, корреляция отсутствовала у 50% видов (рис. 2А). Такие же результаты показал анализ видов по месту произрастания (рис. 2Б). В лесном сообществе произрастают виды с высокой корреляцией между климатическими факторами и продолжительностью цветения (72,7%), в степи доля таких видов меньше (52,4%).

Мы проследили, какие климатические параметры влияют на цветение растений в большей степени, а какие – в меньшей. Высокая корреляция между продолжительностью цветения и значениями температуры воздуха текущего вегетационного периода была обнаружена у 35 (41,2%) видов. Корреляция между продолжительностью цветения и количеством осадков обнаружена у 32 (37,7%) видов. Корреляция между продолжительностью цветения и обоими параметрами (а также ГКС) обнаружена у 18 (21,1%) видов.

В подавляющем большинстве случаев продолжительность цветения отрицательно коррелировала со значениями температуры воздуха. Лишь в некоторых случаях корреляция была положительной. К этой группе относятся следующие виды<sup>1</sup>: *Althaea cannabina* L. (CAT за период  $>10^{\circ}\text{C}$ ;  $r = 0,833$ ), *Crocus angustifolius* Weston (температура воздуха в период бутонизации;  $r = 0,850$ ), *Quercus pubescens* Willd. (температура воздуха в период бутонизации;  $r = 0,838$ ), *Acer campestre* L. (температура воздуха в период бутонизации;  $r = 0,731$ ), *Linum pallasianum* Schult. (температура воздуха в период бутонизации;  $r = 0,905$ ), *Scilla autumnalis* L. (CAT за период  $>10^{\circ}\text{C}$ ;  $r = 0,779$ ) и *Salvia tesquicola* Klok.

et Pobed. (температура воздуха в месяц начала цветения вида;  $r = 0,802$ ).

Продолжительность цветения видов в большинстве случаев положительно коррелировала с количеством осадков. Исключение составили следующие виды: *Inula germanica* L. (количество осадков в период бутонизации;  $r = -0,854$ ), *Cruciata taurica* (Pall. ex Willd.) Soo (количество осадков за период  $>10^{\circ}\text{C}$ ;  $r = -0,802$ ), *Galium biebersteinii* Ehrend. (количество осадков за год;  $r = -0,9$ ) и *Myosotis arvensis* (L.) Hill (количество осадков в период бутонизации;  $r = -0,812$ ).

ГКС оказывал влияние на продолжительность цветения у 9 видов растений. Чаще всего продолжительность цветения коррелировала с этим параметром положительно. Лишь в двух случаях была отмечена отрицательная корреляция: *Acer campestre* ( $r = -0,745$ ) и *Corydalis paczoskii* N. Busch ( $r = -0,838$ ).

В отличие от текущего вегетационного сезона, предыдущий вегетационный сезон оказывал незначительное влияние на продолжительность цветения: корреляция была отмечена у 18 (11,8%) видов. Из них у 13 (72,2%) видов продолжительность цветения коррелировала с ГКС и количеством осадков за период  $>10^{\circ}\text{C}$ , у 5 (27,8%) видов отмечена корреляция с САТ за период  $>10^{\circ}\text{C}$  (таблица). В первом случае корреляция была положительной, во втором – отрицательной.

### Обсуждение

Разные виды по-разному реагируют на изменение климата [4, 15]. В одних случаях изменения климатических условий могут влиять на продолжительность репродуктивных фаз бутонизации, цветения и плодоношения, как, например, было отмечено у однолетних и многолетних растений [2, 16]. В других случаях жизненный цикл может сохранять свою структуру и продолжительность, но сдвигаться во времени [17, 18]. В наших исследованиях мы затронули только продолжительность цветения видов, однако

<sup>1</sup> Здесь и далее в скобках приводится климатический параметр, который был проанализирован, и коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ).

влияние климатических факторов на даты бутонизации, появления первого цветка, окончания цветения также интересно и перспективно для дальнейшего изучения.

Малоизученным на сегодняшний день остается вопрос о том, какие именно климатические факторы влияют на цветение растений. Большинство исследователей отмечают, что основным фактором, оказывающим влияние на цветение, является температура воздуха [3, 19, 20]. Однако в наших исследованиях осадки играли не менее важную роль в сезонном развитии растений. Объяснением этому могут служить: 1) осадки в регионе исследования являются ограничивающим фактором для функционирования растений; 2) как отмечали Гордо и Сэнз [6], значение температуры для растений может быть переоценено, т.к. немногие исследователи оценивали влияние других факторов. Между тем, на цветение могут оказывать влияние фотопериод, биотические связи, структура растительных сообществ. Малоизученным остается также вопрос степени влияния температуры на поверхности почвы и влажности почвы на сроки и продолжительность цветения.

В наших исследованиях продолжительность цветения видов в подавляющем большинстве отрицательно коррелировала с температурой воздуха и положительно — с количеством осадков. Исследования других авторов показали как отрицательную корреляцию продолжительности цветения

с температурой воздуха [20, 21], так и положительную [22, 23]. В работах по изучению влияния количества осадков на продолжительность цветения корреляция всегда была положительной [23, 24].

Рассмотрим виды, у которых не выявлено влияние климатических факторов на продолжительность цветения. Самый высокий процент их был выявлен среди видов, цветущих в середине и конце лета, т.е. в экстремально жаркий период (рис. 1Г). Из этого наблюдения можно сделать вывод, что виды, наиболее адаптированные к произрастанию в данных условиях, менее всего подвержены влиянию климата. В пользу такого утверждения также говорят следующие факты: высокий процент видов с отсутствием корреляции отмечен среди эуксерофитов и видов, произрастающих в петрофитной степи; высокий процент видов, подверженных влиянию погодных условий, выявлен среди мезофитов и видов, произрастающих в лесном сообществе (рис. 2). Однако существует и другая версия, согласно которой весенние и зимние условия более подвержены колебаниям по сравнению с другими сезонами, и весенне-зимние виды более чувствительны к таким колебаниям [6, 25]. Именно поэтому многие исследователи при изучении влияния изменений климата на цветение растений ограничиваются, как правило, только весенними видами (как наиболее информативными) и исключительно датами появления первых цветков [4, 15, 26].

Таблица

Виды, продолжительность цветения которых коррелировала с климатическими факторами предыдущего вегетационного сезона

| № п/п | Виды                            | Климатические показатели                  |                                    |                                         |
|-------|---------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
|       |                                 | Сумма активных температур за период >10°C | Количество осадков за период >10°C | Гидротермический коэффициент Селянинова |
| 1.    | <i>Valerianella turgida</i>     |                                           | $r = 0,829^*$                      | $r = 0,752^*$                           |
| 2.    | <i>Ajuga orientalis</i>         |                                           | $r = 0,775^*$                      | $r = 0,762^*$                           |
| 3.    | <i>Cotoneaster tauricus</i>     | $r = -0,799^*$                            |                                    |                                         |
| 4.    | <i>Trifolium leucanthum</i>     |                                           | $r = 0,900^*$                      | $r = 0,975^*$                           |
| 5.    | <i>Scorzonera mollis</i>        |                                           | $r = 0,900^*$                      | $r = 0,900^*$                           |
| 6.    | <i>Ranunculus illyricus</i>     |                                           | $r = 0,853^*$                      | $r = 0,926^*$                           |
| 7.    | <i>Jurinea sordida</i>          |                                           | $r = 0,667^{**}$                   | $r = 0,699^*$                           |
| 8.    | <i>Nocca praecox</i>            |                                           | $r = 0,790^*$                      | $r = 0,770^*$                           |
| 9.    | <i>Galium biebersteinii</i>     |                                           | $r = 0,900^*$                      | $r = 0,872^*$                           |
| 10.   | <i>Plantago lanceolata</i>      |                                           | $r = 0,929^*$                      | $r = 0,901^*$                           |
| 11.   | <i>Ornithogalum flavescens</i>  | $r = -0,841^*$                            |                                    |                                         |
| 12.   | <i>Reseda lutea</i>             | $r = -0,841^*$                            |                                    |                                         |
| 13.   | <i>Arabis sagittata</i>         | $r = -0,943^*$                            |                                    |                                         |
| 14.   | <i>Echium russicum</i>          |                                           | $r = 0,975^*$                      | $r = 1,000^*$                           |
| 15.   | <i>Torilis arvensis</i>         | $r = -0,964^*$                            |                                    |                                         |
| 16.   | <i>Microthlaspi perfoliatum</i> |                                           | $r = 0,731^*$                      | $r = 0,752^*$                           |
| 17.   | <i>Cerastium brachypetalum</i>  |                                           | $r = 0,810^*$                      | $r = 0,771^*$                           |
| 18.   | <i>Lamium purpureum</i>         |                                           | $r = 0,833^*$                      | $r = 0,819^*$                           |

Примечание: В таблице указан коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r): \* —  $p \leq 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,1$ .

Среди видов с различной биоморфой по вегетации самый высокий процент видов с отсутствием корреляции был отмечен у эфемеров и эфемероидов (рис. 1В); вечнозеленые растения мы не учитывали, т.к. эта группа включает всего два вида. На наш взгляд, эфемеры и эфемероиды следуют иной стратегии жизни. На неблагоприятные погодные-климатические условия они реагируют отсутствием цветения, прекращением роста вплоть до перехода в состояние вторичного покоя. В неблагоприятные годы цветение эфемеров и эфемероидов отсутствовало. Эти годы в анализе не участвовали, и корреляция по фенологическим рядам относительно благополучных лет отмечена не была. Таким образом, влияние климатических факторов на такие растения можно выявить, учитывая не только продолжительность цветения, но и факт отсутствия цветения.

Существует большое количество данных о том, что влияние климата на физиологию растений проявляется с задержкой [5, 6]. Тем не менее, наши исследования показали слабую зависимость продолжительности цветения от климатических факторов предыдущего вегетационного периода. Она наблюдалась у весенне- и ранне-летнецветущих видов, у которых закладка и формирование цветочных почек, а также созревание семян приходятся на жаркий летний период. Из многолетников к таким видам, например, относятся: *Ajuga orientalis* L., *Scorzonera mollis* Bieb., *Ranunculus illyricus* L., *Jurinea sordida* Stev., *Noccaea praecox* (Wulf.) F.K. Mey. и др. Из однолетников: *Valerianella turgida* (Stev.) Betcke, *Trifolium leucanthum* Bieb., *Torilis arvensis* (Huds.) Link, *Microthlaspi perfoliatum* (L.) F.K. Mey., *Cerastium brachypetalum* Desp. ex. Pers., *Lamium purpureum* L. (таблица). Продолжительность цветения напрямую зависит от обилия цветков и численности растений. Таким образом, погодные условия пре-

дыдущего вегетационного периода могут опосредованно влиять на продолжительность цветения: чем больше будет заложено цветочных почек (или созреет семян у видов-однолетников), тем длиннее будет продолжительность цветения вида.

### Заключение

Таким образом, корреляционный анализ между продолжительностью цветения видов сосудистых растений, произрастающих в Карадагском природном заповеднике, и климатическими факторами выявил высокую зависимость у 89 (58,6%) видов из 152 исследованных. Температура и осадки текущего вегетационного периода на продолжительность цветения оказывали примерно одинаковое влияние: у 35 видов была обнаружена высокая корреляция между продолжительностью цветения и значениями температуры воздуха, у 32 видов — между продолжительностью цветения и количеством осадков, у 18 видов было зафиксировано влияние обоих параметров. При этом чаще всего продолжительность цветения отрицательно коррелировала со значениями температуры воздуха и положительно — с количеством осадков. Наиболее чувствительные к климатическим факторам оказались мезофиты, произрастающие в лесных сообществах, наименее чувствительные — эуксерофиты, произрастающие в степных сообществах. Климатические показатели предыдущего вегетационного периода оказывают незначительное влияние на продолжительность цветения видов.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского — природного заповедника РАН, № 121032300023-7. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IPCC, 2022: Climate change 2022: Impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change / Eds. H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, and B. Rama. Cambridge; N.Y.: Cambridge Univ. Press, 2022. 3056 pp.
2. Craufurd P.Q., Wheeler T.R. Climate change and the flowering time of annual crops // J. Exp. Bot. 2009. Vol. 60. N 9. P. 2529–2539.
3. Menzel A., Sparks T.H., Estrella N., et al. European phenological response to climate change matches the warming pattern // Glob. Change Biol. 2006. Vol. 12. N 10. P. 1969–1976.
4. Harper G., Morris L. Flowering and climate change // Sibbaldia. 2007. N. 5. P. 25–42.
5. Miller-Rushing A.J., Primack R.B. Global warming and flowering times in Thoreau's Concord: a community perspective // Ecology. 2008. Vol. 89. N 2. P. 332–341.
6. Gordo O., Sanz J.J. Impact of climate change on plant phenology in Mediterranean ecosystems // Glob. Change Biol. 2010. Vol. 16. N 3. P. 1082–1106.
7. Richardson A.D., Keenan T.F., Migliavacca M., Ryu Y., Sonnentag O., Toomey M. Climate change, phenology, and phenological control of vegetation feedbacks to the climate system // Agric. For. Meteorol. 2013. Vol. 169. P. 156–173.
8. Memmott J., Craze P.G., Waser N.M., Price M.V. Global warming and the disruption of plant-pollinator interactions // Ecol. Lett. 2007. Vol. 10. N 8. P. 710–717.
9. Tooke F., Battey N.H. Temperate flowering phenology // J. Exp. Bot. 2010. Vol. 61. N 11. P. 2853–2862.

10. Nagahama A., Kubota Y., Satake A. Climate warming shortens flowering duration: a comprehensive assessment of plant phenological responses based on gene expression analyses and mathematical modeling // *Ecol. Res.* 2018. Vol. 33. N 5. P. 1059–1068.
11. Dorji T., Hopping K.A., Meng F., Wang S., Jiang L., Klein J.A. Impacts of climate change on flowering phenology and production in alpine plants: The importance of end of flowering // *Agric. Ecosyst. Environ.* 2020. Vol. 291: 106795.
12. Sparks T. H., Menzel A., Stenseth N.C. European cooperation in plant phenology // *Clim. Res.* 2009. Vol. 39. N 3. P. 175–177.
13. Czerepanov S.K. Vascular plants of Russia and adjacent states (the former USSR). Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1995. 516 pp.
14. Голубев В. Н. Биологическая флора Крыма. Ялта: НБС–ННЦ, 1996. 120 с.
15. Zheng J.Y., Ge Q.S., Hao Z.X., Wang W.C. Spring phenophases in recent decades over eastern China and its possible link to climate changes // *Clim. Change.* 2006. Vol. 77. N 3. P. 449–462.
16. Sherry R.A., Zhou X., Gu.S., Arnone J.A., Schimel D.S., Verburg P.S., Wallace L.L., Luo Y. Divergence of reproductive phenology under climate warming // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. Vol. 104. N 1. P. 198–202.
17. Post E.S., Pedersen C., Wilms C.C., Forchhammer M.C. Phenological sequences reveal aggregate life history response to climate warming // *Ecology.* 2008. Vol. 89. N 2. P. 363–370.
18. Steltzer H., Post E. Seasons and life cycles // *Science.* 2009. Vol. 324. N 5929. P. 886–887.
19. Sparks T.H., Jeffree E.P., Jeffree C.E. An examination of the relationship between flowering times and temperatures at the national scale using long-term phenological records from the UK // *Int. J. Biometeorol.* 2000. Vol. 44. N 2. P. 82–87.
20. Bock A., Sparks T.H., Estrella N., Jee N., Casebow A., Schunk C., Leuchner M., Menzel A. Changes in first flowering dates and flowering duration of 232 plant species on the island of Guernsey // *Glob. Change Biol.* 2014. Vol. 20. N 11. P. 3508–3519.
21. Зыкова В.К., Клименко З.К. Продолжительность цветения сортов сирени коллекции Никитского ботанического сада // *Бюллетень ГНБС.* 2019. № 130. С. 69–72.
22. Zhou Z., Zhang K., Sun Z., Liu Yi., Zhang Yu., Lei L., Li Yi., Wang D., Hu M., Wang Sh., Lu Q., Cui Yu., Zhong M., Han Sh., Miao Yu. Lengthened flowering season under climate warming: evidence from manipulative experiments // *Agric. For. Meteorol.* 2022. Vol. 312: 108713.
23. Зубкова Н.В. Особенности цветения некоторых видов и форм рода *Clematis* L. Коллекции Никитского ботанического сада // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Хим. Биол. Экол.* 2018. Т. 18. № 1. С. 60–64.
24. Вострикова Т.В., Калаев В.Н., Воронин А.А., Преображенский А.П., Львович И.Я. Влияние природно-климатических факторов на фенологические показатели петунии гибридной // *Вест. ВГТУ.* 2011. Т. 7. № 3. С. 56–60.
25. Schwartz M.D., Ahas R., Aasa A. Onset of spring starting earlier across the Northern Hemisphere // *Glob. Change Biol.* 2006. Vol. 12. N 2. P. 343–351.
26. Badeck F., Bondeau A., Böttcher K., Doktor D., Lucht W., Schaber J., Storch S.A. Responses of spring phenology to climate change // *New Phytol.* 2004. Vol. 162. N 2. P. 295–309.

Поступила в редакцию 25.08.2022

После доработки 14.10.2022

Принята в печать 11.11.2022

## RESEARCH ARTICLE

# Impact of climatic factors on the duration of species flowering in the Karadag Nature Reserve

V.Ju. Letukhova\*, A.V. Zuev, I.L. Potapenko

T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station — Nature Reserve, Russian Academy of Sciences,  
24 Nauki str., Kurortnoje, Feodosia, Crimea, 298188, Russia

\*e-mail: letukhova@gmail.com

The phenological responses of plants to changing weather conditions are very strong and can serve as an indicator of global climate change. If we understand how individual species respond to changing conditions, we can represent how ecosystems will change. The aim of this study was to analyze the exposure of climatic factors (air temperature and precipitation) on the flowering duration of the wild vascular plants species in the Karadag Nature Reserve (Crimea). In general, 152 species were taken into account with a number of phenological observations from 5 to 8 years. Correlation analysis between the flowering duration and the climatic parameters revealed a significant response in 89 (58.6%) species. Moreover, the climatic factors of the current vegetative season impacted 71 species flowering, previous vegetative season impacted 4 species flowering, and both vegetative seasons impacted 14 species flowering. Air temperature and precipitation equally impacted the flowering duration: air temperature impacted 35 (41.2%) species flowering; precipitation impacted 32 (37.7%) species flowering; both factors impacted 18

(21.1%) species flowering. The flowering duration mostly was negatively correlated with air temperature values and positively with precipitation amount. Mesophytes and the forest community species were the most sensitive to the climatic factors; euxerophytes and the steppe community species were the least sensitive to the climatic factors.

**Keywords:** *climate influence, vascular plants, flowering phenology, monitoring, Karadag Reserve, Crimea.*

**Funding:** The research was funded by the state assignment of T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS, project number 121032300023-7.

### Сведения об авторах

*Летухова Виктория Юрьевна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела изучения биоразнообразия и экологического мониторинга КНС — ПЗ РАН — филиала ФИЦ ИнБЮМ. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: letukhova@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9740-0320>.

*Зуев Александр Васильевич* — инженер отдела изучения биоразнообразия и экологического мониторинга КНС — ПЗ РАН — филиала ФИЦ ИнБЮМ. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: lizaveta-zueva@mail.ru

*Потапенко Ирина Леонидовна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела изучения биоразнообразия и экологического мониторинга КНС — ПЗ РАН — филиала ФИЦ ИнБЮМ. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: ira\_potapenko@mail.ru

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 579.22:579.676

**Анализ кефирных зерен из разных регионов планеты  
с применением высокопроизводительного секвенирования****Ф. Дин<sup>1, 2</sup> , А.А. Красильникова<sup>1</sup> , М.Р. Леонтьева<sup>1</sup> ,  
Л.Г. Стоянова<sup>1</sup> , А.И. Нетрусов<sup>1, 3, \*</sup> **<sup>1</sup>Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>Shenzhen MSU-BIT University, No 299, Ruyi Road, Longgang District, Shenzhen, Guangdong, 518172, China;<sup>3</sup>Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, ул. Мясницкая, д. 20, Москва, 101000, Россия

\*e-mail: anetrusov@mail.ru

Исследовали таксономический состав и пространственную локализацию дрожжей и бактерий в кефирных зернах (КЗ), полученных для изучения из разных регионов планеты. Показано разнообразие их микробиома с помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК бактерий и области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей. Установлено, что основными представителями сложного сообщества КЗ из разных регионов являются молочнокислые бактерии (лактобациллы, лактококки и *Leuconostoc* spp. в разных соотношениях) и разные виды дрожжей рода *Kazachstania* (сем. Saccharomycetaceae). В КЗ из Тибета выявлены уксуснокислые бактерии и незначительный процент дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, а в КЗ из Осетии — дрожжи *Pichia kluyveri*.

**Ключевые слова:** дрожжи, кефирные зерна, лактобактерии, микробиом, высокопроизводительное секвенирование

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-266-272

В последние годы большое внимание уделяется созданию и введению в рацион человека полезных продуктов с пробиотическими микроорганизмами для организации функционального питания. Одним из самых популярных молочных продуктов, с неоспоримой пользой от употребления, является кефир, который можно приготовить из различных видов молока, таких как коровье, козье, буйволиное, овечье или верблюжье, путем микробного сбраживания (заквашивание молока кефирными зернами, КЗ) [1, 2]. Кефир — традиционный напиток, считающийся «функциональной пищей» благодаря своим питательным и оздоровительным свойствам. Его производят путем сбраживания лактозы молока видами микроорганизмов, присутствующими в КЗ [1]. Кефирные зерна содержат пробиотические микроорганизмы, которые существуют в сложной матрице из белков и полисахаридов [3, 4]. Существует симбиотическая связь между микроорганизмами, присутствующими в КЗ, в которой бактерии и дрожжи выживают и делятся своими биопродуктами как источниками энергии и микробными факторами роста. Этот консорциум микроорганизмов отвечает за гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение и спиртовое брожение [5, 6]. Молочнокислые бактерии (МКБ) являются основной популяцией в КЗ с небольшим содержанием

дрожжей, погруженных в полисахаридные слои кефирана, который представляет собой гетерополисахарид, состоящий из равных пропорций глюкозы и галактозы, образуемый *Lactobacillus kefirifaciens* [4, 7]. Более 23 различных видов дрожжей были выделены из КЗ и из полученных с их помощью напитков различного происхождения, при этом преобладающими видами явились различные виды дрожжей, являющиеся пробиотическими культурами [6, 8, 9]. При сбраживании молока КЗ образуются многие функциональные соединения, такие как биоактивные пептиды (например, с антигипертензивной, антиоксидантной, противоаллергенной, противоопухолевой, противовоспалительной и снижающей холестерин активности) [10], антимикробные соединения (например, органические кислоты, спирты, диоксид углерода и бактериоцины) и гетерополисахариды (например, кефиран) с потенциальной пробиотической активностью [11]. Исследования показывают, что пробиотические бактерии в кишечнике регулярных потребителей кефира более многочисленны, что коррелирует с улучшением здоровья [1–3, 12]. В связи с этим растет интерес к использованию кефира и применению его как важного компонента функционального питания.

Благодаря постоянному развитию современных молекулярных технологий, таких как высоко-

производительные технологии секвенирования, становится возможным более глубокий анализ сложного микробного сообщества КЗ. Во многих лабораториях мира постоянно ведут исследования по дальнейшему изучению свойств КЗ и кефирана для разработки новых важных функциональных продуктов, биологически активных добавок и лекарственных средств. Необходимо создание устойчивых пробиотических микробных сообществ из выделенных и изученных культур КЗ, выявление и устранение возможного антагонизма между выбранными культурами.

Целью настоящей работы было изучение микробиома КЗ, выделенных из разных территориальных зон, для создания устойчивых микробных сообществ и эффективных пробиотических продуктов, полезных для здоровья.

Материалы и методы

Для проведения исследований получали КЗ из частных хозяйств разных регионов традиционного его применения, включая Кавказ (Северная Осетия), Тибетскую область Китая и Московскую область (таблица). Все зерна хранили в лиофильном состоянии в коллекции культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Таблица

Образцы КЗ, взятые для исследований

| Регион выделения КЗ | Шифр культуры |
|---------------------|---------------|
| Москва              | N5            |
| Северная Осетия     | OS            |
| Тибет               | T2-3          |

**Выращивание КЗ.** Лиофилизированные КЗ активировали в стерильном 1,5%-ном молоке с регулярными пересевами (2 раза в нед.) при комнатной температуре (21–22°C). При пересевах КЗ отмывали на стерильных ситах стерильным физиологическим раствором от накопившихся полисахаридов. Зерна в молоке хранили при 4°C.

**Микроскопия КЗ.** Для установления пространственного расположения микроорганизмов в КЗ проводили сканирующую электронную микроскопию препаратов зерен, выделенных из различных зон: ближе к поверхности и в центре [6]. Частицы КЗ, промытые стерильной водой, фиксировали в течение 30 мин в 2,5%-ном глutarовом альдегиде на фосфатном буфере (1,8 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 137 мМ  $\text{NaCl}$ ; 2,7 мМ  $\text{KCl}$ ) и затем обезвожены в серии спиртов возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) и далее в смесях абсолютного спирта и ацетона (3:1, 1:3, 1:3). Далее образцы помещали в абсолютный ацетон и проводили высушивание гидратированного материала методом «критической точки» (ВКТ) в HCP-2 Critical Point Dryer (Hitachi, Япония). Высушенные препараты

прикрепляли на специальные столики двусторонней клейкой лентой и напыляли смесью Au–Pd в ионно-распылительной установке (Eiko IB-3 Ion Coater, Hitachi, Япония). Изучение образцов проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL, Япония) в центре коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ имени М.В. Ломоносова (уникальная научная установка «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия»), и с помощью сканирующего электронного микроскопа SU-8010 (Hitachi, Япония) в МГУ-ППИ в Шэньчжэне.

**Высокопроизводительное секвенирование микробиома КЗ.** ДНК из образцов была выделена с использованием Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, США) в соответствии с инструкцией производителя. Коллекции ампликонов *фрагментов генов* 16S рРНК были получены методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами к участку V4 по ранее описанной методике [13]. Были использованы следующие праймеры: 515F: 5' GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3' [14], Pro-mod-805R: 5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3' [15]. Секвенирование проводили на приборе MiSeq System (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (MS-103-1002, Illumina, США) считывающих по 150 нуклеотидов с каждого конца. Демультимплексирование, последующая обработка и анализ полученных сиквенсов были проведены с использованием соответствующих скриптов QIIME 2 программного обеспечения ver. 2019.1 [16]. Таблица операционных таксономических единиц (OTU) была составлена в программе SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>).

Область ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК была амплифицирована из ДНК КЗ с использованием набора праймеров для полимеразной цепной реакции BITS (5'-ACCTGCGGARGGATCA-3') и B58S3 (5'-GAGATCCRTTGYTRAAAGTT-3') для области ITS1 [17]. После амплификации полученные участки очищали магнитными шариками AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., США) и готовили к секвенированию с помощью набора Nextera XT DNA в соответствии с инструкциями производителя (Illumina, Inc., США). С помощью системы UPARSE сиквенсы были собраны, отфильтрованы и дуплицированы [18].

OTUs были объединены в группы с идентичностью последовательности  $\geq 97\%$ , из которых были удалены химеры с использованием SILVAngs pipeline (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>) для участка V4 гена 16S rRNA и knomics/biota pipeline (<https://biota.knomics.ru>) для области ITS1 ДНК дрожжей.

Таксономическая идентичность была присвоена с использованием BLASTn и справочной базы

данных Fittings v. 1-2 [19]. Таксономия и операционные таксономические единицы были преобразованы в таблицу с помощью формата файлов BIOM (версия V1.3.1 [20]).

**Статистическая обработка результатов.** Все эксперименты были проведены в трех независимых биологических повторностях. Статистическую обработку данных проводили с использованием Excel (Microsoft Office, США). Значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

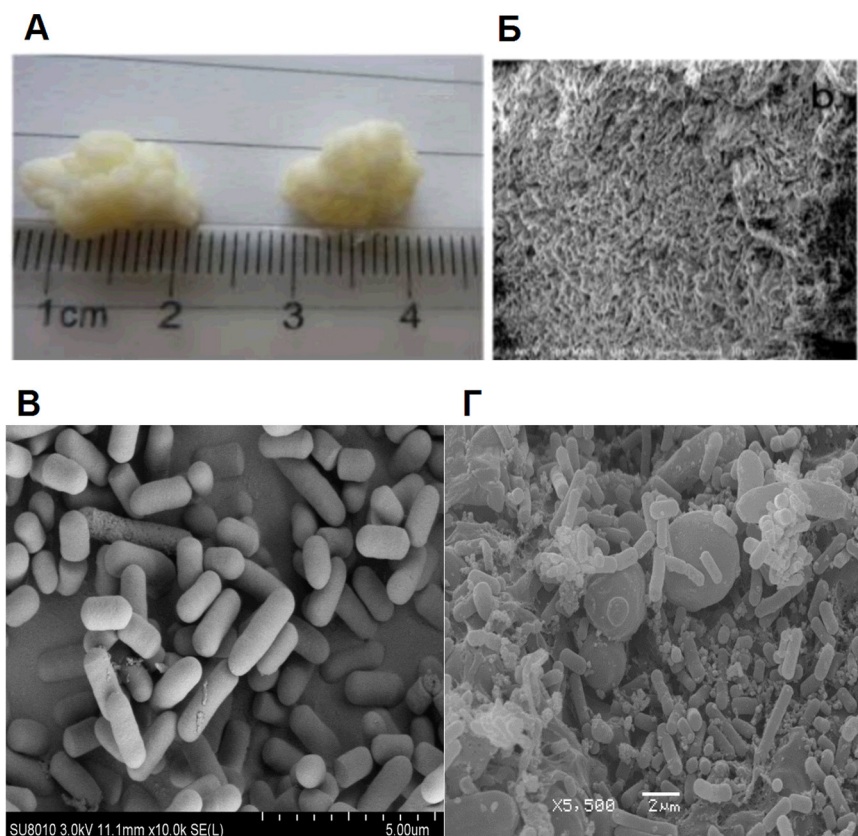
КЗ можно описать как студенистые белые или слегка желтоватые массы эластичной консистенции, размером от 0,3 до 3,5 см в диаметре, похожие на маленькие головки (кочанчики) цветной капусты, погруженные в матрикс экзополисахаридов (рис. 1, А и Б).

**Пространственная локализация дрожжей и бактерий в КЗ.** Изученные КЗ продемонстрировали тесную пространственную связь бактерий и дрожжей на поверхности зерен (рис. 1Г). Во внутренних частях КЗ обнаружили практически полное отсутствие клеток дрожжей (рис. 1В), видны только клетки МКБ (1–4 мкм в длину). На внешней стороне КЗ видны крупные (7–8 мкм) клетки дрожжей со шрамами от отделившихся почек (рис. 1Г) и тесно прилегающие к ним клетки МКБ (1–3 мкм в длину).

Это отражает метаболические потребности бактерий и дрожжей, их отношение к молекулярному кислороду. Так, дрожжи, являясь аэробными организмами, приспособливают свое местоположение в зерне ближе к поверхности (рис. 1Г), тогда как МКБ, являясь аэротолерантными анаэробами, располагаются как на поверхности, тесно прилекая к клеткам дрожжей, так и занимают весь внутренний объем зерна. Такое тесное прилегание бактерий к клеткам дрожжей наводит на мысль о химических связях этих микроорганизмов и облигатной зависимости МКБ от дрожжей, которые снабжают клетки бактерий биологически активными веществами, ростовыми компонентами и витаминами. Тесные симбиотические отношения молочнокислых бактерий и дрожжей, стимулирующих рост МКБ, были отмечены многими исследователями [3–6, 21–24].

Клетки же дрожжей, особенно те, которые не способны метаболизировать лактозу молока, облигатно зависят от МКБ, активно расщепляющих лактозу молока на глюкозу и галактозу. Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями в КЗ до конца не изучены. Однако когда бактерии отделены от зерна, дрожжи не будут расти так эффективно [2].

**Определение родового состава бактериальных культур в КЗ.** Исследования, начатые в 1980-х гг., показали, что филогенетическое сравнение видов



**Рис. 1.** Микрофотографии КЗ из Тибета (Т2-3). А — внешний вид; Б — поверхность кефирного зерна в сканирующем электронном микроскопе (Hitachi SU-8010; увеличение  $\times 5000$ ); В — внутренняя часть кефирного зерна (увеличение  $\times 40000$ ); Г — внешняя поверхность кефирного зерна (увеличение  $\times 40000$ ).

микроорганизмов с использованием консервативной области генома является более точным и стабильным для выявления их сходства или различия. Таким образом, использование сравнения последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, вошло в повседневную практику при установлении филогенетических отношений. Ген 16S рРНК состоит из множества вариабельных и консервативных областей, поэтому с целью таксономического сравнения были разработаны универсальные праймеры для всего гена 16S рРНК, который включает и консервативные, и вариабельные области, причем гипервариабельные области с соответствующими праймерами чаще используют для таксономического сравнения. Высокопроизводительное секвенирование вариабельных областей генов, кодирующих синтез бактериальных 16S рРНК в микробиоме зерен, проводили с целью выявления родового бактериального разнообразия образцов из Осетии (OS), образца N5 из г. Москвы и T2-3 из Тибета.

При сравнении КЗ из разных географически расположенных зон установлено, что основными бактериальными представителями их состава являются *Lactobacillus* и *Lactococcus* (рис. 2). По результатам секвенирования можно видеть, что в наших исследуемых КЗ лактобациллы и лактококки присутствуют практически в равных отношениях в образце из московского региона (40 и 41%), с не-

большим преобладанием лактобацилл в образцах из Осетии (50% к 34%), а в КЗ из Тибета больше выявлено лактококков (46%), чем лактобацилл (32%). Во всех образцах в небольших количествах были обнаружены гетероферментативные МКБ *Leuconostoc* spp.: 11% – в осетинском образце, 9% – в образце из Москвы и лишь 2% – в тибетском образце. Лейконостоки определяют аромат кефира, поскольку, являясь гетероферментативными МКБ, образуют молочную и уксусную кислоту, углекислый газ, этиловый спирт, эфиры, ароматические вещества ацетон и диацетил, а также декстран, способствующий образованию матрицы КЗ [21, 22].

В микробиоме КЗ присутствуют и другие бактерии в незначительных количествах. В образце из Тибета нашли представителей рода *Acetobacter* (18%), что согласуется с экспериментальными данными китайских ученых [21]. Бактерии из семейства *Acetobacteriaceae* класса альфа-протеобактерий окисляют этанол до уксусной кислоты, а ацетат и лактат – до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , и создают матрицу бактериальной целлюлозы в КЗ.

Рибосомальный кластер эукариот имеет в своем составе два внутренних транскрибируемых спейсера – ITS1 и ITS2, которые разделяют в рибосомной ДНК гены 18S, 5.8S и 28S РНК. Данные последовательности представляют собой объединение ядерных генов, которые располагаются

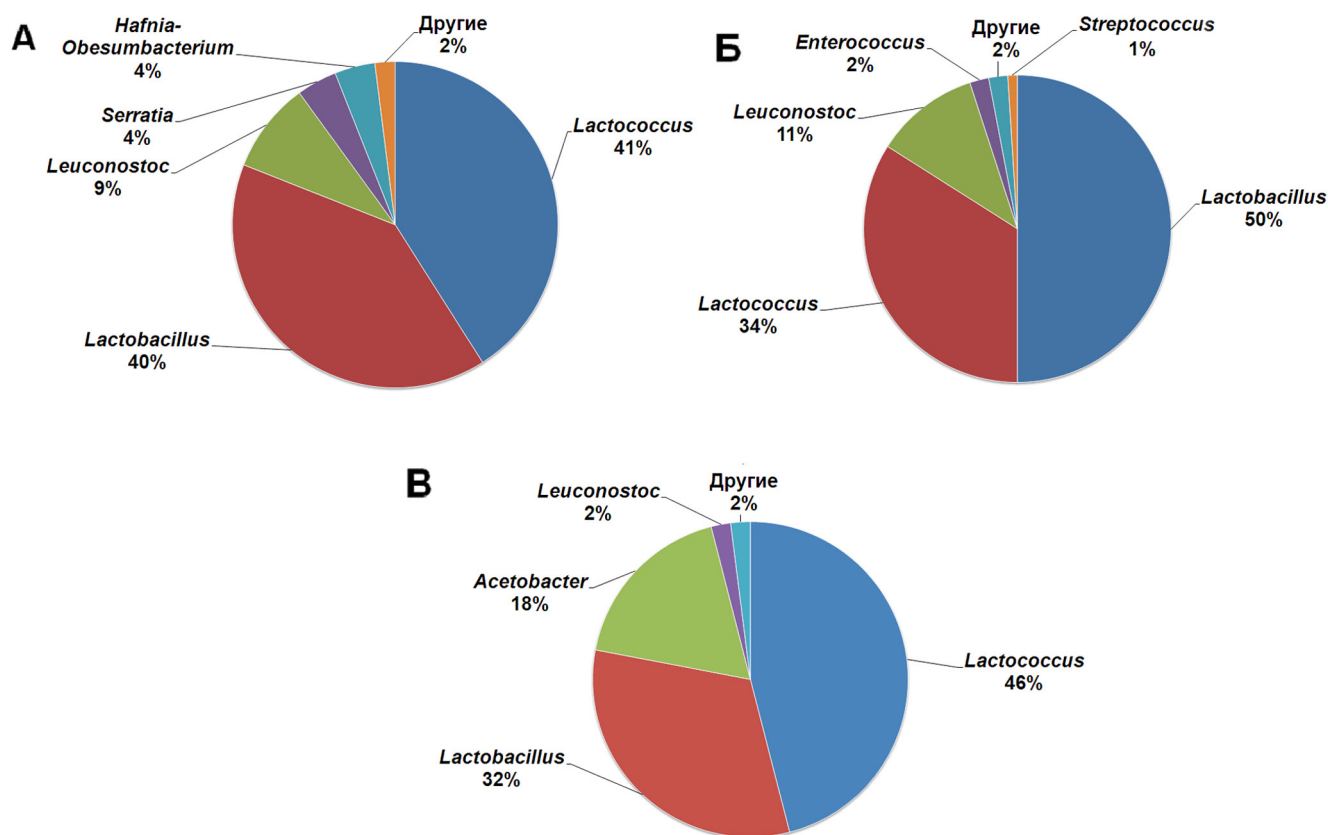


Рис. 2. Бактериальный состав микробиоты КЗ из разных регионов по результатам высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК. Образцы: А – из Москвы (N5); Б – из Осетии (OS); В – из Тибета (T2-3)

в виде tandemных повторов и при этом последовательности ITS1 и ITS2 содержат участки рибосомальных генов.

Как видно из рис. 3, в микробиоте всех образцов КЗ присутствуют дрожжи *Kazachstania turicensis*, независимо от региона их выделения. Это – бывший вид *Saccharomyces* sp., часто выделяемый из разных КЗ и упоминавшийся в работах китайских ученых [21, 22]. Но в образцах КЗ из Тибета и Москвы обнаружены еще и дрожжи *Kluyveromyces marxianus*, которые выявлены и в кефире из Аргентины. Эти дрожжи составляют большинство или всю популяцию дрожжей, использующих лактозу, и обладают пробиотическими свойствами [8]. Невысокое в процентном соотношении (0,12%) присутствие дрожжей класса *Saccharomycetes*, *Pichia kluyveri*, обнаружено в образцах из Осетии. Эти дрожжи относятся к филуму *Ascomycota*, размножаются почкованием, отличаются быстрым ростом (достигают зрелости через 72 ч) и часто встречаются в КЗ из Китая или Испании [21, 22, 24]. Совместное сосуществование разных видов дрожжей и бактерий свидетельствует об их симбиотических, взаимовыгодных взаимоотношениях.

Проведенные исследования показали определенное филогенетическое разнообразие составляющих микробиом КЗ микроорганизмов, отобранных для исследований из разных регионов их исторического происхождения. С использованием метода высокопроизводительного секвенирова-

ния микробиома КЗ показано, что основными представителями сложного сообщества КЗ являются МКБ (лактобациллы и лактококки в разных соотношениях, а также *Leuconostoc* spp.), и разные виды дрожжей родов *Kazachstania* и *Kluyveromyces* в КЗ из различных регионов. Установлены и отличия в составе их микробиомов, причем МКБ родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* составляли около 80% от всех прочтений с бактериальными праймерами, а МКБ рода *Leuconostoc* – от 2 до 11%, что должно существенным образом влиять на вкус и текстуру конечного напитка. Обнаруженное значительное количество бактерий семейства *Acetobacteriaceae* в КЗ из Тибета (18% от всех бактериальных прочтений) свидетельствует о неминуемом появлении уксусного привкуса и запаха в конечном продукте, который в таком виде может не понравиться потребителю, особенно в детском возрасте.

В отношении дрожжей различия еще нагляднее: так, в дрожжах из Тибета и Осетии выявлено почти полное доминирование представителей рода *Kazachstania* (96% и 94% от всех прочтений соответственно), однако видовое соотношение – прямо противоположное. В КЗ из Осетии преобладает вид *K. turicensis* (81% прочтений), тогда как в тибетских КЗ – *K. unispора* (87% прочтений), что явно свидетельствует о разнообразии КЗ разных регионов и возможном влиянии дрожжевого и бактериального разнообразия на качество кефи-ров, из них вырабатываемых. Влияние установ-

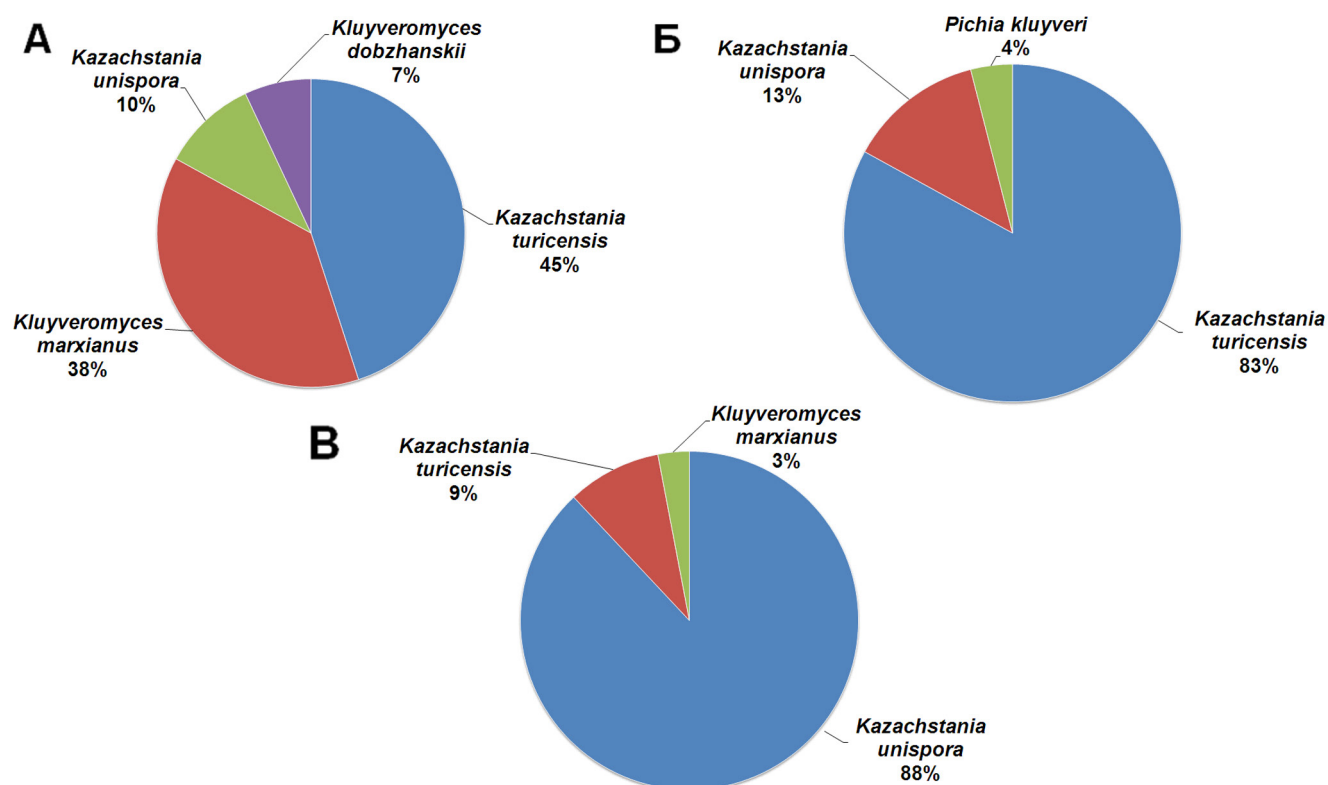


Рис. 3. Разнообразие дрожжей в составе КЗ из разных регионов по результатам высокопроизводительного секвенирования. Образцы: А — из Москвы (N5); Б — из Осетии (OS); В — из Тибета (T2-3)

ленного микробного разнообразия КЗ на потребительские свойства кефирных напитков предстоит еще изучать с привлечением специалистов — нутриционистов и дегустаторов.

Пространственная локализация дрожжей и бактерий в КЗ подтверждает их различное отношение к молекулярному кислороду. При этом дрожжи тяготеют к внешним слоям КЗ, тогда как МКБ стараются занимать внутренние их области, где концентрация кислорода в значительной степени снижена вследствие высокой дыхательной активности поверхностных дрожжей.

Полученные экспериментальные данные после выделения чистых культур дрожжей и бактерий из КЗ могут быть использованы для создания

устойчивых пробиотических микробных сообществ и продуктов функционального питания, необходимых в период пандемии коронавирусной инфекции.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке правительства провинции Шэньчжэнь, Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэнь и в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ № 23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farag M.A., Jomaa S.A., El-Wahed A.A. The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety // *Nutrients*. 2020. Vol. 12. N 2. P. 346–359.
2. Nejati F., Junne S., Neubauer P. A big world in small grain: a review of natural milk Kefir starters // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8. N 2: 192.
3. Khokhlacheva A.A., Egorova M.A., Kalinina A.N., Gradova N.B. Trophic patterns of functioning and microbial profile of an evolutionarily established associative culture of kefir grains // *Microbiology*. 2015. Vol. 84. N 4. P. 466–447.
4. Radhouani H., Goncalves C., Maia F.R., Oliveira J.M., Reis R.L. Biological performance of a promising kefir-biopolymer with potential in regenerative medicine applications: a comparative study with hyaluronic acid // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2018. Vol. 29. N 8: 124.
5. Kotova I.B., Cherdynseva T.A., Netrusov A.I. Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process // *Advances in microbiology, infectious diseases and public health*, vol. 932 / Ed. G. Donelli. Cham: Springer, 2016. P. 93–102.
6. Wang S.Y., Chen K.N., Lo Y.M., Chiang M.L., Chen H.C., Liu J.R., Chen M.J. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain // *Food Microbiol.* 2012. Vol. 3. N 2. P. 274–285.
7. Zajšek K., Kolar M., Goršek A. Characterisation of the exopolysaccharide kefir produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains // *Int. J. Dairy Technol.* 2011. Vol. 6. N 4. P. 544–548.
8. Diosma G., Romanin D.E., Rey-Burusco M.F., Londero A., Garrote G.L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 30. N 1. P. 43–53.
9. Zanirati D.F., Abatemarco M., Cicco Sandesb S.H., Nicolai J.R., Nunes A.C., Neumann E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures // *Anaerobe*. 2015. Vol. 3. N 2. P. 70–76.
10. Amorim F.G., Coitinho L.B., Dias A.T., Friques A.G.F., Monteiro B.L., de Rezende L.C.D., Pereira T.D.M.C., Campagnaro B.P., De Pauw E., Vasquez E.C., Quinton L. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteo-peptidomics: bioprospection of antihypertensive molecules // *Food Chem.* 2019. Vol. 28. N 2. P. 109–119.
11. Cotârleț M., Vasile A.M., Cantaragiu A.M., Gaspar-Pintilieșcu A., Crăciunescu O., Oancea A., Moraru A., Moraru I., Bahrim G.E. Colostrum-derived bioactive peptides obtained by fermentation with kefir grains enriched with selected yeasts // *Ann. Univ. Dunarea Jos Galati Fascicle VI: Food Technol.* 2019. Vol. 4. N 3. P. 54–68.
12. Ahmed Z., Wang Y., Ahmad A., Khan S. T., Nisa M., Ahmad H. Kefir and health: a contemporary perspective // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013. Vol. 5. N 3. P. 422–434.
13. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. Vol. 24. N 2. P. 16–25.
14. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. Vol. 80. N 16. P. 5116–5123.
15. Merkel A.Yu., Tarnovetskii I.Yu., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // *Microbiology*. 2019. Vol. 13. N 6. P. 671–680.
16. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nat. Biotechnol.* 2019. Vol. 37. N 8. P. 852–857.
17. Bokulich N.A., Mills D.A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. Vol. 79. N 8. P. 2519–2526.
18. Willger S.D., Grim S.L., Dolben E.L., Shipunova A., Hampton T.H., Morrison H.G., Filkins L.M., O'Toole G.A., Moulton L.A., Ashare A., Sogin M.L., Hogan D.A. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis // *Microbiome*. 2014. Vol. 2. N 1: 40.
19. Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nat. Methods*. 2013. Vol. 10. N 10. P. 996–998.
20. Dannemiller K.C., Reeves D., Bibby K., Yamamoto N., Peccia J. Fungal high-throughput taxonomic identifi-

cation tool for use with next-generation sequencing (FHiT-INGS) // J. Basic Microbiol. 2014. Vol. 5. N 4. P. 315–321.

21. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QI-ME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. Vol. 7. N 5. P. 335–336.

22. Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J., Mingsheng D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis // Food Microbiol. 2009. Vol. 26. N 8. P. 770–775.

23. Gao J., Gu F., Abdella N. H., Ruan H., He G. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China // J. Food Sci. 2012. Vol. 77. N 8. P. 425–433.

24. Zheng Y., Lu Y., Wang J., Yang L., Pan C., Huang Y. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan Kefir grains // PLoS One. 2013. Vol. 8: e69868.

25. Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elgueabala N., Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities // Rev. Iberoam. Micol. 2006. Vol. 23. N 1. P. 67–74.

Поступила в редакцию 14.05.2022

После доработки 23.08.2022

Принята в печать 10.11.2022

## SHORT COMMUNICATION

### Analysis of kefir grains from different regions of the planet using high-throughput sequencing

F. Ding<sup>1,2</sup> , A.A. Krasilnikova<sup>1</sup> , M.R. Leontieva<sup>1</sup> ,  
L.G. Stoyanova<sup>1</sup> , A.I. Netrusov<sup>1,3,\*</sup> 

<sup>1</sup>Microbiology Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Shenzhen MSU-BIT University, No 299, Ruyi Road, Longgang District, Shenzhen, Guangdong, 518172, China;

<sup>3</sup>Faculty of Biology and Biotechnology, High School of Economics, 20 Mjasnitskaja str., Moscow, 101000, Russia

\*e-mail: anetrusov@mail.ru

The taxonomic composition and spatial localization of yeast and bacteria in kefir grains (KG) obtained for study from different regions of the planet were investigated. The diversity of their microbiome has been demonstrated by high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA genes and the ITS1 region of the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S complex of yeast rRNA. It has been established that the main representatives of the complex community of KG from different regions are lactic acid bacteria (LAB; lactobacilli, lactococci and *Leuconostoc* spp. in different ratios), and different types of yeast of the genus *Kazachstania* (family Saccharomycetaceae). Acetic acid bacteria and a small percentage of yeast *Kluyveromyces marxianus* were detected in the KG from Tibet, and yeast *Pichia kluyveri* was detected in the KG from Ossetia.

**Keywords:** yeasts, kefir grains, lactobacilli, microbiome, high-performance sequencing

**Funding:** The research was carried out with financial support of Shenzhen province Government and MSU-BIT joint University in Shenzhen (PRC), and as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No. 23-1-21 (registered no. 121032300094-7).

#### Сведения об авторах

Дин Фань — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: dingfan0110@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9614-3388>

Красильникова Анна Александровна — студентка кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-42-23; e-mail: akzayka@gmail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-5968-764X>

Леонтьева Мария Романовна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-45-45; e-mail: x\_blade@inbox.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7150-9010>

Стоянова Лидия Григорьевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-45-45; e-mail: stoyanovamsu@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1192-2863>

Нетрусов Александр Иванович — докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-83; e-mail: anetrusov@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2803-3037>

## МНЕНИЕ

УДК 57.017.67+612.67+612.397.81

## О холестериновой теории старения – 2022

А.Н. Хохлов 

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

Излагается точка зрения автора, согласно которой сформулированная еще в 80-х гг. прошлого века Ю.М. Лопухиным с соавторами холестериновая теория старения и смерти часто неправильно воспринимается в настоящее время многими биологами и медиками. Подчеркивается, что в этой теории во главу угла ставилась не общеизвестная роль холестерина (ХС) в процессах метаболизма, а его структурная роль в плазматической мембране клетки. Предполагалось, что увеличение микровязкости клеточной мембраны за счет накопления в ней ХС приводит к ухудшению поступления в клетку внешних сигналов и питательных веществ, а также к снижению активности мембранных ферментов. Это, по мнению авторов, и запускает возникновение «старческих» изменений клеток, тканей и органов, а потом и всего многоклеточного организма, что в конце концов приводит к увеличению вероятности его смерти, то есть к старению. При этом содержанию ХС (главным образом – считающегося особенно «плохим» ХС липопротеидов низкой плотности) в сыворотке отводилась лишь второстепенная роль, ибо его повышение совсем не обязательно, по мнению авторов концепции, ведет к неблагоприятным изменениям в организме. В настоящей работе кратко рассматривается эволюция представлений о возможной роли ХС в старении и формировании различной возрастной патологии – главным образом, сердечно-сосудистых заболеваний и ментальных расстройств. Анализируются экспериментальные данные о влиянии липосом, содержащих как обычный, так и окисленный ХС, на пролиферативную активность культивируемых клеток. Рассматриваются данные лонгитудинальных исследований, позволяющие полагать, что, как ни парадоксально, именно люди с повышенным содержанием ХС в плазме крови доживают до преклонного возраста. При этом потребление большого количества пищи, богатой ХС, может никак не влиять на здоровье некоторых пациентов. Отмечается, что целый ряд работ свидетельствует об отсутствии причинно-следственной связи между уровнем ХС в сыворотке и возникновением атеросклеротических изменений. Подчеркивается, что ХС является очень важным для нашего организма соединением, без которого невозможны клеточная пролиферация и, как следствие, нормальная регенерация. Отмечается непрерывно увеличивающееся количество данных о негативной роли статинов в формировании возрастной патологии – особенно у людей старших возрастных групп. Заключается, что в настоящее время становится очевидной необходимость существенного пересмотра (с использованием системного подхода) представлений о возможной роли ХС в старении, развитии атеросклероза и других возрастных заболеваний, включая деменции, вызванные различными причинами, в том числе и болезнь Альцгеймера.

**Ключевые слова:** старение, смерть, холестерин, сердечно-сосудистые заболевания, биомембраны, метаболизм, питание

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-273-278

Летом 2022 г. я давал Первому медицинскому каналу интервью (<https://www.youtube.com/watch?v=qDudNipYIs0>) под названием «Как геронтологи изучают старение: есть ли шансы на победу?». В числе прочего был затронут вопрос о возможной роли холестерина (ХС) в старении и возникновении возрастной патологии (в частности, сердечно-сосудистых заболеваний). Я сказал, что распространенная точка зрения, согласно которой употребление в пищу большого количества пищи, содержащей ХС, приводит к повышению его содержания в сыворотке крови, что неминуе-

мо влечет за собой вред для нашего здоровья, не совсем верна. При этом я сослался на результаты Лейпцигского лонгитудинального исследования [1, 2]. В процессе многолетних наблюдений за его участниками выяснилось, что действительно у старых людей в среднем концентрация ХС в крови повышена (о чем свидетельствовали и данные многочисленных проведенных ранее поперечных исследований), однако она у них была значительно выше средней и в раннем возрасте. Таким образом, оказалось, что до преклонного возраста доживают как раз те обследуемые, у которых ХС

в крови изначально много, а вот те, у кого этот показатель снижен, умирают гораздо раньше. Это является классическим примером феномена дифференциальной смертности, которая во многих случаях приводит к некорректным выводам при поперечных геронтологических исследованиях.

Кроме того, в интервью я упомянул тот факт, что довольно часто потребление большого количества куриных яиц, богатых ХС, не приводит к появлению атеросклеротических бляшек и развитию сердечно-сосудистой патологии [3].

У ведущей Первого медицинского канала, которая брала у меня интервью, озвученные факты вызвали неоднозначную реакцию. Она сказала, что в течение многих лет врачи, являющиеся основными зрителями канала, объясняли своим пациентам, что они должны избегать потребления продуктов с высоким содержанием ХС, а теперь получается, что они все делали неправильно. Она предложила «смягчить» то, что я сказал, и сформулировать вывод, согласно которому ХС, как правило, вреден, но надо обязательно учитывать метаболические особенности конкретного человека.

В связи с вышеупомянутым, в настоящей дискуссионной статье мне хотелось бы кратко рассмотреть эволюцию представлений о возможной роли ХС в старении и формировании возрастной патологии, рассмотрев некоторые работы, авторы которых пришли к тем же выводам, что и я.

Еще в 80-х гг. прошлого века была опубликована монография «Холестериноз» Ю.М. Лопухина с коллегами [4], в одной из глав которой авторы изложили свою «холестериновую» теорию старения и естественной смерти. Авторы подчеркивали (см. главу 7 этой книги), что они на первый план выдвигают не общеизвестную роль ХС в процессах метаболизма как предшественника стероидных гормонов и желчных кислот, а его структурную роль в клеточной мембране клетки. Поэтому, по их мнению, задача поддержания холестеринвого гомеостаза (который обеспечивается уравниванием потоков поступления и выведения стероидов из организма) сводится к поддержанию строго определенной его концентрации в плазматической мембране. Отмечалось, что накопление ХС в плазматической мембране (увеличение соотношения ХС/фосфолипиды) приводит к увеличению ее вязкости и, соответственно, к ухудшению способности к передаче внешних сигналов и поступлению питательных веществ внутрь клетки, а также к снижению активности различных мембранных ферментов. Если в раннем возрасте такие процессы служат сигналом к синтезу ДНК и делению клеток, в результате которого все показатели сбрасываются до исходных значений (без высоких показателей содержания ХС в плазматической мембране клеток их пролиферация — а, значит, и нормальные процессы регенерации тканей и органов — просто будут не-

возможны), то в старости, когда скорость обновления клеточной популяции сильно замедляется, они вызывают, как полагали Лопухин и его соавторы, «старческие» изменения клеток, а затем и тканей, органов и физиологических систем организма, что приводит к увеличению вероятности его смерти, т.е. к старению. Накоплению ХС в плазматической мембране клеток также способствует то обстоятельство, что в старости начинает расти содержание ХС в организме из-за снижения его расходования на стероидогенез. Авторы подчеркивали, что предлагаемая ими гипотеза старения и смерти принципиально отличается от других концепций тем, что она рассматривает в качестве ведущего фактора в механизме старения повышение вязкости плазматической мембраны, т.е. это физическая гипотеза (в отличие от большинства других, являющихся химическими, ибо речь в них идет о нарушениях структуры и функции отдельных молекул, участвующих в биологических процессах).

Необходимо заметить, что характер влияния ХС на клетки в эксперименте зависит от того, какие его модификации используются, а также от того, на каких конкретно клеточных культурах проводятся исследования. В конце 80-х гг. прошлого века мы изучали влияние липосом, содержащих ХС и 7-кетоХС на образование колоний культивируемыми клетками китайского хомячка линии B11-dii FAF28 [5, 6]. Оказалось, что липосомы, в которых 25% ХС было заменено на 7-кетоХС, полностью подавляют колониеобразование, в то время как способность к образованию колоний клеток, на которые действовали липосомами, не содержащими окисленного ХС, снижалась лишь на 90%. При этом в последнем случае происходило перераспределение колоний по классам: в классе с наибольшим размером колоний («256 и более клеток») их количество сильно снижалось, а колонии «перетекали» в два соседних класса с меньшими размерами («199–255 клеток» и «128–191 клетка»). Мы предположили, что корреляция между концентрацией ХС (или его окисленных производных) в плазматической мембране клетки и ее пролиферативной активностью является двунаправленной: изменение любого из этих показателей влечет за собой изменение другого.

В одной из появившихся в то время публикаций [7] ее автор, Г. Каунитц, отмечал, что «липидная теория», согласно которой ХС является ведущим фактором в развитии атеросклероза, противоречит эволюционному принципу «телеономии»: продолжающиеся длительное время метаболические процессы должны иметь полезные для вида последствия. Кроме того, ХС — это соединение, совершенно необходимое для функционирования живого организма, ибо он не только используется для построения мембран вновь образующихся клеток, но и является предше-

ственным стероидных гормонов, витамина Д и др. Автор подчеркнул, что имевшиеся на то время сведения о корреляции между уровнем ХС в сыворотке и выраженностью атеросклеротических изменений (базирувавшиеся, в частности, на результатах экспериментов по кормлению животных пищей, богатой ХС, а также на данных о нарушении функционирования сердца у пациентов с семейной гиперхолестеринемией) не подтверждали правоту сторонников «липидной теории». По мнению Каунитца, корреляции не доказывают причинно-следственные связи: соответствие данных экспериментов на животных и результатов наблюдений за пациентами с гиперхолестеринемией совсем не очевидно. Автор предположил, что изменения содержания ХС отражают функционирование некоего адаптивного механизма. По его мнению, эта идея поддерживается: 1) «нормальным» уровнем ХС на стадии ранних повреждений стенки аорты; 2) стабилизацией спирали ДНК при соответствующих концентрациях ХС; 3) положительным влиянием богатых ХС гранулем; 4) испытаниями диет с низким содержанием ХС; 5) наблюдениями, согласно которым пациенты, умирающие от ишемической болезни сердца (у них высокое содержание ХС в сыворотке) живут не меньше, чем люди, умирающие от других причин. Каунитц также подчеркнул, что данные исследований, посвященных препаратам, понижающим уровень ХС, по его мнению, достаточно трудно однозначно интерпретировать в силу их очевидной противоречивости. Автор заключил, что симптоматика изменений концентрации ХС в сыворотке при атеросклерозе позволяет считать их проявлениями феномена «адаптивного старения». Это, по его мнению, соответствует представлениям об механизмах эволюции.

Любопытно, что в одной из своих следующих публикаций (на мой взгляд, довольно провокационной) Г. Каунитц, основываясь на анализе обширных демографических данных, изложил свою идею [8] о том, что развитие ранних стадий атеросклероза является адаптивным процессом, который увеличивает среднюю ожидаемую продолжительность жизни пациентов. В связи с этим автор сформулировал весьма спекулятивную точку зрения, согласно которой определенные вирусы – особенно вирус герпеса человека – участвуют в развитии атеросклеротических изменений. Почти все люди приобретают вирус герпеса в детстве, и этот вирус, как ни парадоксально, может быть фактором увеличения ожидаемой продолжительности жизни. Каунитц ссылается на явления симбиоза и гормезиса, изучение которых, по его мнению, свидетельствует о частом положительном влиянии паразитов в небольших количествах на организм хозяина. И опять-таки он подчеркивает, что такие соображения вполне укладываются в наши представления об эволюции.

Публикации такого рода появлялись тогда регулярно (в частности, была развернута дискуссия о неочевидной роли холестерина в развитии патологии желчного пузыря, а также других «функциональных болезней» [9]), однако на общепринятую в медицинской среде точку зрения, касающуюся роли ХС в развитии возрастных болезней, это не очень повлияло.

В 1996–1997 гг. я сделал пару докладов на международных геронтологических симпозиумах [10, 11] под названием «Холестериновая теория старения и смерти: попытка пересмотра», в которых попытался снова привлечь внимание коллег к данной проблеме. Кратко рассмотрев изложенную выше холестериную концепцию старения и смерти [4], я подчеркнул также следующие известные факты: 1) в неделящихся культивируемых клетках различной природы, претерпевающих так называемое «стационарное старение» (накопление в клетках вследствие ограничения их пролиферации различных повреждений, характерных для клеток состарившихся многоклеточных организмов [12–17]), ХС накапливается в плазматической мембране, повышая ее вязкость; 2) воздействие на «старые» клетки препаратов липосом, экстрагирующих ХС из клеточных мембран, приводит к их «омоложению»; 3) действие на быстро делящиеся трансформированные культивируемые клетки препаратами липосом, повышающими содержание ХС в клеточных мембранах, резко снижает их способность к пролиферации, т.е. делает их «старше» [4–6]. В заключение я отметил, что, по моему мнению, хотя изменения плазматической мембраны клеток играют очень важную роль в регуляции процессов старения на клеточном уровне, первичное «включение» этих процессов все-таки происходит на уровне хроматина (вернее, ДНК; если заменить «испорченные» белки или липиды можно достаточно легко молекулами, синтезированными *de novo*, повреждение главной матрицы во многих случаях может стать необратимым, даже при активно функционирующей системе репарации ДНК).

Надо сказать, что, как ни странно, опубликованные резюме этих докладов даже привлекли внимание главного редактора известного геронтологического журнала «Journal of Gerontology», который прислал мне письмо с предложением опубликовать в этом издании обзорно-дискуссионную статью на данную тему. К сожалению, до такой статьи у меня тогда руки не дошли, о чем я теперь сильно жалею.

В последующие годы интерес к цепочке «ХС – питание – атеросклероз – старение – возрастные болезни» волнообразно то затухал, то вновь возрастал, причем акцент в соответствующих публикациях смещался в сторону критики «стандартных» представлений о роли ХС в формировании возрастной патологии [18–20]. Особенно это ста-

ло заметным в последние годы, когда появилось большое количество публикаций о необходимости пересмотра причинно-следственных связей в данной цепочке [21–31]. В частности, все больше специалистов подчеркивает весьма вероятную негативную роль статинов (препаратов, направленных на снижение в организме концентрации ХС липопротеидов низкой плотности) в развитии возрастной патологии — особенно у людей старших возрастных групп [27, 31]. Впрочем, эта идея довольно четко была изложена уже в книге Лопухина и соавторов [4].

Интересно также отметить, что ряд данных, полученных южнокорейскими учеными [32], свидетельствует о том, что не общее содержание ХС у людей, а его вариабельность (от одного визита к врачу к другому) является фактором риска развития деменций, вызванных различными причинами, в том числе и болезни Альцгеймера.

Наиболее ярким противником идеи о «плохом» ХС и пользе статинов мне представляется Стивен Синатра, который еще в 2012 г. совместно с Джонни Боуденом опубликовал книгу под названием «The Great Cholesterol Myth» («Великий холестерин миф»), в которой постулировал пользу обогащенной жирами диеты для предотвращения многих возрастных болезней и подвергнул жесткой критике широко пропагандируемую пользу «низкого ХС». В 2022 г. вышла переработанная и дополненная версия этой книги [27]. К сожалению, в этом же году д-р Синатра умер.

Таким образом, как мне кажется, в настоящее время (в 2022 г.) со всей очевидностью назрела необходимость серьезного пересмотра наших представлений о «плохом» и «хорошем» ХС, а также

о его возможной роли в старении и формировании возрастных болезней (главным образом, сердечно-сосудистых). Я специально не стал в этой короткой дискуссионной статье останавливаться на популярных у врачей представлениях о том, что только ХС липопротеидов низкой плотности, обеспечивающий транспорт ХС из печени к тканям и органам (и соответственно, к составляющим их клеткам), является «плохим», а ХС липопротеидов высокой плотности, транспортирующий ХС обратно в печень, где он утилизируется и затем выводится из организма, — «хорошим». Анализ (часто критический) этих представлений можно найти в большом количестве соответствующих публикаций. Как, впрочем, и данные о роли клеточных рецепторов липопротеидов низкой плотности, за открытие которых Майкл Браун и Джозеф Голдштейн, занимавшиеся изучением семейной гиперхолестеринемии, получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1985 г. В любом случае, очевидно, что, несмотря на позицию, которую занимает в обсуждаемом вопросе конкретный ученый, он должен понимать, что системный подход [30] к анализу данной проблемы совершенно необходим и может нам помочь наконец-то продвинуться в вопросе о новых подходах к борьбе со старением, а также с сердечно-сосудистыми заболеваниями и ментальными расстройствами.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № 121032300215-6), без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ries W., Hunecke I., Reuter W., Sauer I. Objectives, organization, and results of the Leipzig longitudinal study // *Age Ageing*. 1985. Vol. 14. N 1. P. 30–36.
2. Busse A., Bischof J., Riedel-Heller S.G., Angermeyer M.C. Mild cognitive impairment: prevalence and incidence according to different diagnostic criteria: Results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+) // *Brit. J. Psych.* 2003. Vol. 182. N 5. P. 449–454.
3. Kern Jr. F. Normal plasma cholesterol in an 88-year-old man who eats 25 eggs a day: mechanisms of adaptation // *N. Engl. J. Med.* 1991. Vol. 324. N 13. P. 896–899.
4. Lopukhin Y.M., Archakov A.I., Vladimirov Y.A., Kogan E.M. Cholesterosis: Cholesterol of biomembranes — theoretical and clinical aspects. N.Y.: Harwood, 1984. 382 pp.
5. Khokhlov A.N., Prokhorov L.Yu., Zakharova T.S., Ivanov A.S., Khalilov É.M., Archakov A.I. Effect of liposomes containing cholesterol for 7-ketocholesterol for colony-forming ability of cells in culture // *Bull. Exp. Biol. Med.* 1989. Vol. 108. N 3. P. 1324–1326.
6. Khokhlov A.N., Prokhorov L.Yu., Ivanov A.S., Archakov A.I. Effects of cholesterol- or 7-ketocholesterol-containing liposomes on colony-forming ability of cultured cells // *FEBS Letters*. 1991. Vol. 290. N 1–2. P. 171–172.
7. Kaunitz H. Adaptive changes in aging and arteriosclerosis — role of cholesterol // *Mech. Ageing Develop.* 1988. Vol. 44. N 1. P. 35–43.
8. Kaunitz H. Virally induced arteriosclerosis: Increased life expectancy? // *Med. Hypotheses*. 1995. Vol. 45. N 4. P. 335–338.
9. Jacyna M.R., Bouchier I.A.D. Cholesterosis: a physical cause of “functional” disorder // *Brit. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. 1987. Vol. 295. N 6599. P. 619.
10. Khokhlov A.N., Shvedova O.V. Once again on the cholesterol theory of aging and death: An attempt of reappraisal (Twenty-sixth annual meeting — American Aging Association. Eleventh annual meeting — American College of Clinical Gerontology) // *Age*. 1996. Vol. 19. N 4. P. 147–173.
11. Khokhlov A.N. The cholesterol theory of aging and death: an attempt of reappraisal // 16th Congress of the International Association of Gerontology (August 19–23, 1997, Adelaide, South Australia) — *Aging Beyond 2000: One World One Future. Book of Abstracts*. 1997 World Congress of Gerontology, Incorporated, 1997. P. 561.
12. Khokhlov A.N. The immortality of the germ line: the neverending story // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 189–193.

13. Morgunova G.V., Karmushakov A.F., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Studies into the effect of “mild” uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 163–169.
14. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Klebanov A.A. Demographic approaches to the study of aging on cell cultures // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 262–267.
15. Morgunova G.V., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N. Effect of caloric restriction on aging: Fixing the problems of nutrient sensing in postmitotic cells? // *Biochemistry (Mosc.)*. 2021. Vol. 86. N 10. P. 1352–1367.
16. Khokhlov A.N. Reflections of a pessimistic gerontologist or why we still do not live 1000 years // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021. Vol. 76. N 4. P. 223–227.
17. Morgunova G.V., Khokhlov A.N. Signs of similarities and differences in cellular models of aging: A scoping review // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022. Vol. 77. N 3. P. 139–146.
18. de Grey A.D.N.J. The mitochondrial free radical theory of aging (*Molecular Biology Intelligence*. Vol. 9). Austin, TX: R.G. Landes Co., 1999. 212 pp.
19. Eastwood M. The great cholesterol myth: unfortunate consequences of Brown and Goldstein’s mistake // *QJM*. 2012. Vol. 105. N 2. P. 214.
20. Postmus I., Deelen J., Sedaghat S., Trompet S., De Craen A.J., Heijmans B.T., Franco O.H., Hofman A., Dehghan A., Slagboom P.E., Westendorp R.G. LDL cholesterol still a problem in old age? A Mendelian randomization study // *Int. J. Epidemiol.* 2015. Vol. 44. N 2. P. 604–612.
21. Neculita C.S., McKay R. The institutionalisation and deinstitutionalisation of the cholesterol theory // *Transnatl. Corp. Rev.* 2020. Vol. 12. N 2. P. 173–192.
22. Mc Auley M.T. Effects of obesity on cholesterol metabolism and its implications for healthy ageing // *Nutr. Res. Rev.* 2020. Vol. 33. N 1. P. 121–133.
23. Morgan A.E., Mc Auley M.T. Cholesterol homeostasis: An *in silico* investigation into how aging disrupts its key hepatic regulatory mechanisms // *Biology (Basel)*. 2020. Vol. 9. N 10: 314.
24. Sittiwet C., Simonen P., Gylling H., Strandberg T.E. Mortality and cholesterol metabolism in subjects aged 75 years and older: the Helsinki Businessmen study // *J. Am. Ger. Soc.* 2020. Vol. 68. N 2. P. 281–287.
25. Maihofer A.X., Shadyab A.H., Wild R.A., LaCroix A.Z. Associations between serum levels of cholesterol and survival to age 90 in postmenopausal women // *J. Am. Ger. Soc.* 2020. Vol. 68. N 2. P. 288–296.
26. Orkaby A.R. The highs and lows of cholesterol: A paradox of healthy aging? // *J. Am. Ger. Soc.* 2020. Vol. 68. N 2. P. 236–237.
27. Bowden J., Sinatra S.T. The great cholesterol myth, revised and expanded: Why lowering your cholesterol won’t prevent heart disease—and the statin-free plan that will. Fair Winds Press, 2020. 384 pp.
28. Anzai T., Grandinetti A., Katz A.R., Hurwitz E.L., Wu Y.Y., Masaki K. 2021. Paradoxical association between atrial fibrillation/flutter and high cholesterol over age 75 years: The Kuakini Honolulu Heart Program and Honolulu-Asia Aging Study // *J. Electrocardiol.* 2021. Vol. 65. P. 37–44.
29. Chee W.Y., Kurahashi Y., Kim J., Miura K., Okuzaki D., Ishitani T., Kajiura K., Nada S., Okano H., Okada M.  $\beta$ -catenin-promoted cholesterol metabolism protects against cellular senescence in naked mole-rat cells // *Commun. Biol.* 2021. Vol. 4. N 1: 357.
30. Mc Auley M.T. Aging and cholesterol metabolism // *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging*. Cham: Springer International Publishing, 2022. P. 220–225.
31. Васильев А.П., Стрельцова Н.Н. Холестерин, его биологическое значение. Атеросклероз. Статинотерапия (Часть 1) // *Сиб. ж. клин. эксп. мед.* 2022. Т. 37. N 1. С. 27–35.
32. Chung H.S., Lee J.S., Kim J.A., Roh E., Lee Y.B., Hong S.H., Kim N.H., Yoo H.J., Seo J.A., Kim S.G., Kim N.H., Baik S.H., Choi K.M. Variability in total cholesterol concentration is associated with the risk of dementia: A nationwide population-based cohort study // *Front. Neurol.* 2019. Vol. 10: 441.

Поступила в редакцию 20.08.2022

После доработки 29.09.2022

Принята в печать 11.10.2022

## OPINION ARTICLE

### On the cholesterol theory of aging – 2022

A.N. Khokhlov 

*Evolutionary Cyto gerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia*

*\*e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

The author’s point of view is presented, according to which, formulated back in the 80s of the last century by Yu.M. Lopukhin et al., the cholesterol theory of aging and death is now often misunderstood by many biologists and physicians. It is emphasized that this theory prioritized not the well-known role of cholesterol (CS) in metabolic processes, but its structural role in the plasma membrane of the cell. It was assumed that an increase in the microviscosity of the cell membrane due to the accumulation of CS in it leads to a deterioration in the transfer of external signals and nutrients to the cell, as well as to a decrease in the activity of membrane enzymes. This, according to the authors, triggers the occurrence of “senile” changes in cells, tissues and

organs, and then in the entire multicellular organism, which ultimately leads to an increase in the probability of its death, that is, to aging. At the same time, the content of CS (mainly, of considered to be especially “bad” CS of low density lipoproteins) in serum was assigned only a minor role, because its increase is not at all necessary, according to the authors of the concept, leads to adverse changes in the body. This paper briefly discusses the evolution of ideas about the possible role of CS in aging and the development of various age-related pathologies, mainly cardiovascular diseases and mental disorders. Experimental data on the effect of liposomes containing both normal and oxidized CS on the proliferative activity of cultured cells are analyzed. The data of longitudinal studies are considered, suggesting that, paradoxically, it is people with elevated levels of CS in the blood plasma who live to an advanced age. At the same time, the consumption of large amounts of food rich in CS may not affect the health of some patients. It is noted that a number of studies indicate the absence of a causal relationship between the level of CS in serum and the occurrence of atherosclerotic changes. It is emphasized that CS is a very important compound for our body, without which cell proliferation and, as a result, normal regeneration are impossible. It is noted that there is a continuously increasing amount of data on the negative role of statins in the formation of age-related pathology, especially in people of older age groups. It is concluded that at present it becomes obvious that there is a need for a significant reappraisal (using the systems approach) of ideas about the possible role of CS in aging, the development of atherosclerosis and other age-related diseases, as well as dementias due to various causes, including Alzheimer’s disease.

**Keywords:** *aging, death, cholesterol, cardiovascular diseases, biomembranes, metabolism, diet*

**Funding:** This work was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032300215-6.

#### Сведения об авторе

*Хохлов Александр Николаевич* — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7454-7023>

**УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ  
«ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕРИЯ 16. БИОЛОГИЯ» В 2022 ГОДУ**

**От редактора**

№ Стр.

|                                                                                                                  |   |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|
| Моргунова Г.В., Хохлов А.Н. 75 лет «Вестнику Московского университета»<br>и 45 лет его биологической серии ..... | 1 | 3 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|

**Обзоры**

|                                                                                                                                                                           |   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----|
| Моргунова Г.В., Хохлов А.Н. Признаки сходства и различия клеточных моделей старения.<br>Обзор предметного поля.....                                                       | 3 | 151 |
| Назаров П.А., Кузнецова А.М., Каракозова М.В. Помпы множественной лекарственной<br>устойчивости как краеугольный камень резистентности бактерий .....                     | 4 | 215 |
| Олескин А.В., Постнов А.Л. Нейромедиаторы как коммуникативные агенты<br>в водных экосистемах .....                                                                        | 1 | 9   |
| Соловченко А.Е., Ткачев Е.Н., Цуканова Е.М., Шурыгин Б.М., Хрущев С.С., Конюхов И.В.,<br>Птушенко В.В. Зимний покой древесных растений и его неинвазивный мониторинг..... | 2 | 51  |
| Фрайкин Г.Я. Фотосенсорные и сигнальные свойства криптохромов .....                                                                                                       | 2 | 65  |
| Швецова А.А., Гайнулина Д.К., Тарасова О.С. Каналы TASK-1: функциональная роль<br>в гладкомышечных клетках артерий .....                                                  | 2 | 76  |

**Оригинальные исследования**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----|
| Байжуманов А.А., Май Л., Юсипович А.И., Максимов Г.В. Антиоксидантная активность<br>некоторых водных экстрактов, применяемых в традиционной китайской медицине .....                                                                                                            | 1 | 16  |
| Васильчук А.Г., Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Алексеева С.В., Качалов К.С., Воронина Т.А.<br>Влияние ингибиторов циклооксигеназы эторикоксиба и диклофенака натрия,<br>а также их комбинаций с мексидолом на артериальное давление и гематологические<br>показатели у крыс ..... | 1 | 22  |
| Волгушева А.А., Петрова Е.В., Кукарских Г.П., Дубини А., Антал Т.К. Роль реакций брожения<br>в длительной продукции водорода на свету клетками микроводоросли<br><i>Chlamydomonas reinhardtii</i> в условиях дефицита серы .....                                                | 1 | 29  |
| Воробьева Н.В., Вахлярская С.С., Черняк Б.В. Роль изоформ протеинкиназы С<br>в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек .....                                                                                                                                             | 2 | 112 |
| Герасимова Н.С., Ахтар М.С., Студитский В.М. Влияние односторонних разрывов ДНК<br>на транскрипцию нуклеосом.....                                                                                                                                                               | 4 | 241 |
| Граф А.В., Байжуманов А.А., Маслова М.В., Крушинская Я.В., Маклакова А.С., Соколова Н.А.,<br>Каменский А.А. Влияние острой гипоксии на разных сроках гестации на показатели<br>окислительного стресса у потомства крыс .....                                                    | 2 | 104 |
| Динариева Т.Ю., Климко А.И., Чердынцева Т.А., Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Витамин К2<br>является медиатором транспорта электронов от НАДН-дегидрогеназы 2<br>к хинолоксидазе <i>bd</i> -типа у <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> КМ МГУ 529 .....                            | 3 | 188 |
| Еникеев Р.Р., Татаринова Н.Ю., Захарчук Л.М., Виноградова Е.Н. Механизмы устойчивости<br>к клинически значимым антибиотикам у штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> ,<br>выделенных из образцов, полученных из медицинского учреждения .....                                    | 2 | 89  |
| Ерохина М.В., Павлова Е.Н., Тарасова Е.К., Курынина А.В., Поташикова Д.М., Лепеха Л.Н.,<br>Эргешов А.Э., Онищенко Г.Е. Наночастицы полимера молочной кислоты с рифампицином<br>снижают активность мультитеарственного транспортера Р-гр в макрофагах человека .....             | 3 | 166 |
| Зворыкин Д.Д. Выбор партнера по размножению и размерная ассортативность спаривания<br>у рыбы-ползуна <i>Anabas testudineus</i> (Actinopteri: Anabantidae) .....                                                                                                                 | 4 | 224 |
| Кривина Е.С., Темралеева А.Д. Морфологический и молекулярно-генетический анализ<br>штаммов зеленых микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов<br>на основе «живой хлореллы» .....                                                                                | 3 | 160 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |   |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----|
| <i>Лебедева Е.И., Бабенко А.С., Щастный А.Т.</i> Уровень экспрессии мРНК <i>CXCL12</i> как независимый маркер прогрессирования фиброза печени у крыс.....                                                                                                                                            | 4 | 248 |
| <i>Ловягина Е.Р., Давлетшина Л.Н., Семин Б.К.</i> Особенности окисления катионов Mn(II) в мембранных препаратах фотосистемы 2 без кислород-выделяющего комплекса. Эволюционный аспект .....                                                                                                          | 2 | 98  |
| <i>Маторин Д.Н., Тодоренко Д.А., Воронов Д.А., Горячев С.Н., Братковская Л.Б., Краснова Е.Д.</i> Особенности распределения и состояния фитопланктона на разных глубинах в озере Кисло-Сладкое Белого моря.....                                                                                       | 3 | 180 |
| <i>Орлов Н.А., Якимов С.А., Некрасова О.В., Феофанов А.В.</i> Рекомбинантные пептиды Ce1 и Ce4 из яда скорпиона <i>Centruroides elegans</i> и их взаимодействие с гибридными каналами KcsA-K <sub>v</sub> 1.X (x = 1, 3, 6) .....                                                                    | 2 | 122 |
| <i>Прокудина О.И.</i> Сравнительное исследование динамики материнского поведения крыс Вистар и крыс линии ГК с предрасположенностью к кататоническим реакциям .....                                                                                                                                  | 2 | 130 |
| <i>Радченко И.Г., Смирнов В.В., Усов Н.В., Сухотин А.А.</i> Сезонная динамика фитопланктона в губе Чупа (Белое море, Кандалакшский залив) .....                                                                                                                                                      | 1 | 37  |
| <i>Тиморшина С.Н., Попова Е.А., Галиакберова А.А., Очнева А.Г., Осмоловский А.А.</i> Протеолитические ферменты микромицетов рода <i>Aspergillus</i> , гидролизующие фибриллярные белки, для биомедицины и биотехнологических процессов.....                                                          | 3 | 195 |
| <i>Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В.</i> Характеристики быстрого натриевого тока в изолированных кардиомиоцитах перепела.....                                                                                                                                                                           | 3 | 173 |
| <i>Челомбитько М.А., Галкин И.И., Плетюшкина О.Ю., Зиновкин Р.А., Попова Е.Н.</i> Влияние антиоксидантов на продукцию хемокина MCP-1 клетками линии EA.hy926 в ответ на IL-6 .....                                                                                                                   | 3 | 201 |
| <i>Швецова А.А., Моргунова Г.В., Новодережкина Е.А., Потехина В.М., Каменский А.А., Тарасова О.С.</i> Механизмы холинергического сокращения гладкой мускулатуры кишечника беломорской трески <i>Gadus morhua marisalbi</i> (Gadidae): вклад различных подтипов М-холинорецепторов и Rho-киназы ..... | 4 | 231 |

### Краткие сообщения

|                                                                                                                                                                                                              |   |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----|
| <i>Дин Ф., Красильникова А.А., Леонтьева М.Р., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И.</i> Анализ кефирных зерен из разных регионов планеты с применением высокопроизводительного секвенирования.....                   | 4 | 265 |
| <i>Осмоловский А.А., Шаш Б., Александрова А.В., Баранова Н.А., Крейер В.Г.</i> Оценка спектра протеолитической активности микромицетов рода <i>Aspergillus</i> по отношению к белкам системы гемостаза ..... | 2 | 138 |

### Мнения

|                                                                 |   |     |
|-----------------------------------------------------------------|---|-----|
| <i>Хохлов А.Н.</i> О холестериновой теории старения – 2022..... | 4 | 273 |
|-----------------------------------------------------------------|---|-----|

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных РИНЦ, ВИНТИ, 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 0,790, показатель CiteScore 2021 (Scopus) англоязычной версии – 1,2.

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 присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

### Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подт-верждают 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, междустрочный интервал – полусторонний, 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). Объёмы, значительно отклоняющиеся 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. Стефанова<sup>1</sup>, Н.Г. Колосова<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

<sup>2</sup> 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

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2022. Т. 77. № 4

литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке: «Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где 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 переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

*Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:*

## Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis

N.A. Stefanova<sup>1</sup>, N.G. Kolosova<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>*Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;*

<sup>2</sup>*Chair 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-A00-000000000000-0).

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 A4). 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 приставленного 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) **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.*

5) **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., Алексеев 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.

**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: 10.02.2022).

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 — CO<sub>2</sub> и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов — обычным шрифтом. Например: ген — *FOXO3*, его продукт — FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

### Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. 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 присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Далее над рукописью работает редактор, исправленный текст и его замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

### Полезные ссылки

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

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

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