

# Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 78 • № 2 • 2023 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзоры

Воробьева Н.В. Нейтрофилы — атипичные антигенпрезентирующие клетки. . . . . 55

### Оригинальные исследования

Яковлев А.Г., Таисова А.С., Фетисова З.Г. Адаптация зеленых фотосинтезирующих бактерий к разной освещенности по данным спектроскопии хлоросом. . . . . 64

Мамчур А.А., Ерема В.В., Каштанова Д.А., Иванов М.В., Юдин В.С., Кескинов А.А., Краевой С.А., Юдин С.М. Изучение конформационной подвижности липид-связывающего сайта изоформ  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  аполипопротеина Е методом молекулярной динамики . . . . . 70

Павлюченкова А.Н., Смирнов М.С., Челомбитько М.А. Влияние карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP) на Fc $\epsilon$ RI-зависимую продукцию цитокинов клетками RBL-2H3 . . . . . 78

Лавренов А.Р., Мышлявкина Т.А., Умнова Н.В., Ким А.И., Румак В.С. Особенности экспрессии маркерных генов рыжей полевки *Clethrionomys glareolus*, отражающие эффекты экотоксичности загрязненной диоксинами среды . . . . . 86

Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Жизнь на краю ареала: сравнительное изучение центральных и краевых популяций *Dactylorhiza traunsteineri* (Orchidaceae) на европейском северо-востоке России. . . . . 95

### Краткие сообщения

Стаханова А.А., Воскресенская О.Г., Голубович В.П., Каменский А.А. Влияние пептида Ac-D-MPRG на основе C-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина(6-9) на поведение крыс разного возраста. . . . . 102

Осмоловский А.А., Шестакова А.А., Суркова Д.Е., Лехотска Р., Пецкова Е. Изучение спектра активности новых штаммов микромицетов рода *Aspergillus* в отношении белков системы гемостаза. . . . . 109

### Мнения

Хохлов А.Н. Основы биологии старения для небиологов МГУ . . . . . 115

© Издательство Московского университета,  
“Вестник Московского университета”, 2023

# Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 78 • No. 2 • 2023 • APRIL — JUNE

Quarterly

Moscow University Press

---

## CONTENTS

### Reviews

Vorobjeva N.V. Neutrophils are atypical antigen-presenting cells . . . . . 55

### Research articles

Yakovlev A.G., Taisova A.S., Fetisova Z.G. Adaptation of green photosynthetic bacteria to different illumination intensity according to spectroscopy data on chlorosomes . . . . . 64

Mamchur A.A., Erema V.V., Kashtanova D.A., Ivanov M.V., Yudin V.S., Keskinov A.A., Kraevoy S.A., Yudin S.M. Molecular dynamics simulation of the conformational mobility of the lipid-binding site in the Apolipoprotein E isoforms  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , and  $\epsilon 4$  . . . . . 70

Pavlyuchenkova A.N., Smirnov M.S., Chelombitko M.A. Effect of 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone carbonyl cyanide (FCCP) on Fc $\epsilon$ RI-dependent cytokine production by RBL-2H3 cells . . . . . 78

Lavrenov A.R., Myshliavkina T.A., Umnova N.V., Kim A.I., Roumak V.S. Peculiarity of marker genes' expression in bank voles *Clethrionomys glareolus* characterizing ecotoxicity effects of the territory contaminated with dioxins . . . . . 86

Kirillova I.A., Kirillov D.V. Living at the edge: a comparative study of the central and marginal populations of *Dactylorhiza traunsteineri* (Orchidaceae) in European Northeast of Russia . . . . . 95

### Short communications

Stakhanova A.A., Voskresenskaya O.G., Golubovich V.P., Kamensky A.A. The effect of the Ac-D-MPRG peptide based on the C-terminal fragment of arginine-vasopressin(6-9) on the character of rats of different . . . . . 102

Osmolovsky A.A., Shestakova A.A., Surkova D.Ye., Lehotská R., Piecková E. Investigation of new *Aspergillus* strains as producers of hemostatically active proteases . . . 109

### Opinion articles

Khokhlov A.N. Basics of biology of aging for MSU non-biologists. . . . . 115

## ОБЗОР

УДК 571.27

**Нейтрофилы – атипичные антигенпрезентирующие клетки****Н.В. Воробьева** 

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

Нейтрофилы представляют собой наиболее многочисленные лейкоциты крови и являются «первой линией» защиты от патогенов в очаге воспаления, где осуществляют такие эффекторные функции, как фагоцитоз, дегрануляция, генерация активных форм кислорода и образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Долгое время считалось, что нейтрофилы являются короткоживущими терминально дифференцированными фагоцитами. Однако эта точка зрения изменилась после того, как было обнаружено, что нейтрофилы способны взаимодействовать с другими популяциями лейкоцитов, а также отвечать за связь между врожденным и адаптивным иммунитетом. В последние годы накопилось много данных, указывающих на способность нейтрофилов приобретать функцию антигенпрезентирующих клеток при патологических и воспалительных состояниях. Кроме того, нейтрофилы могут экспрессировать молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II и костимулирующие молекулы при воздействии специфических цитокинов в системе *in vitro* и активировать Т-лимфоциты. В обзоре обобщены сведения последних лет об антигенпрезентирующей функции нейтрофилов, предполагаемых механизмах регуляции этого процесса и его значении в норме и патологии.

**Ключевые слова:** *нейтрофил, антигенпрезентирующая клетка, презентация антигена, главный комплекс гистосовместимости, цитокины, хемокины*

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-8

**СОКРАЩЕНИЯ:**

АПК – антигенпрезентирующая клетка;  
АФК – активные формы кислорода;  
БЦЖ – противотуберкулезная вакцина (сокр. от Бацилла Кальмёта-Герёна);  
Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор;  
ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор;  
ДК – дендритная клетка;  
дЛУ – дренирующий лимфатический узел;  
ИЛ-1 – интерлейкин-1;  
ИФН- $\gamma$  – интерферон  $\gamma$ ;  
ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны;  
ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат;  
фМЛФ – *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин;

ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ ;  
CD80/86 – костимулирующие молекулы CD80/86 (clusters of differentiation 80/86);  
CXCL – хемокиновый лиганд (C-X-C motif chemokine ligand);  
CXCR4 – рецептор хемокинов 4-го типа (C-X-C chemokine receptor type 4);  
Ii – инвариантная цепь (Invariant chain);  
МНС – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex);  
NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps);  
NETоз – форма клеточной гибели нейтрофилов, сопровождаемая выбросом NET;  
TCR – Т-клеточный рецептор (T-cell receptor);  
TLR – толл-подобный рецептор (Toll-like receptor)

## 1. Введение

Нейтрофилы представляют собой короткоживущие терминально дифференцированные клетки врожденного иммунитета, обеспечивающие «первую линию» защиты от патогенов в очаге воспаления. Нейтрофилы, являясь «профессиональными» фагоцитами, содержат в своих гранулах огромный антимикробный арсенал, позволяющий им вместе с активными формами кислорода (АФК) уничтожать патогены внутри фагосомы (фагоцитоз). Антимикробные ферменты также могут выделяться клетками в процессе дегрануляции. Третий защитный механизм заключается в высвобождении нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET, от Neutrophil Extracellular Trap) [1]. Вместе с макрофагами, тучными клетками, эозинофилами, дендритными клетками (ДК) и естественными киллерами нейтрофилы составляют клеточное звено врожденного иммунитета.

Нейтрофилы относятся к гранулоцитам и содержат в цитозоле огромное количество гранул, различающихся по составу, структуре и функциям, и которые традиционно подразделяют на четыре типа: азурофильные (или первичные), специфические (или вторичные), желатиновые (или третичные) и секреторные везикулы [2]. Гранулы формируются во время пролиферации и дифференцировки нейтрофилов в костном мозге, этот процесс контролируется гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ) и занимает около 6 сут [3].

Другой характерной особенностью нейтрофилов является наличие сегментированного ядра. А поскольку количество ядерных сегментов варьирует от 3 до 5, то нейтрофилы иногда называют полиморфноядерными лейкоцитами.

Наличие гранул и сегментированного ядра свидетельствует о зрелости нейтрофила. Зрелые нейтрофилы ежедневно выходят из костного мозга в количестве  $10^9$  клеток на 1 кг массы тела человека [4] и мигрируют в кровотоки, где обеспечивают гомеостаз организма. Продолжительность жизни нейтрофилов в кровотоке по некоторым данным [5] не превышает 8 ч. По мере старения нейтрофилов на их поверхности начинает экспрессироваться гораздо больше молекул рецептора хемокинов 4-го типа (CXCR4, C-X-C chemokine receptor type 4), что способствует их возвращению в костный мозг и последующему разрушению и уничтожению макрофагами [6]. Однако время жизни нейтрофилов увеличивается, если они перемещаются из кровотока в ткани, привлекаемые таким хемокинами, цитокинами или хемоаттрактантами, как ИЛ-1 (интерлейкин-1), ИЛ-2, ИЛ-15, фактор некроза опухоли (ФНО)- $\alpha$ , Г-КСФ, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), липополисахариды и интерфероны (ИФН) I типа [7, 8]. Интересно,

что в системе *in vitro* продолжительность жизни нейтрофилов также варьирует в зависимости от состава и концентрации добавленных цитокинов. Было показано, что инкубация нейтрофилов в присутствии ГМ-КСФ, ИФН- $\gamma$  и ИЛ-3 продлевает жизнь до 72 ч у 30% клеток [9]. В другой работе было установлено, что нейтрофилы, стимулированные ГМ-КСФ, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-4, выживали в течение 9 сут в системе *in vitro* [10].

Поскольку основной функциональной задачей нейтрофилов является обнаружение и устранение инфекции, в этом процессе принимают участие рецепторы, распознающие микробные мишени непосредственно или при помощи опсопинов. Такие чужеродные мишени, как бактерии, грибы и простейшие обладают множественными молекулами, которые были названы патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (ПАМП). ПАМП распознаются рядом сенсоров, включающих толл-подобные рецепторы (TLR, Toll-like receptor). Хотя нейтрофилы экспрессируют практически все типы TLR кроме TLR3, наиболее распространенными среди них являются TLR2 и TLR4 [11].

Кроме того, четыре биохимически различные семейства хемоаттрактантов привлекают нейтрофилы человека из кровотока в ткани: хемотаксические липиды (например, лейкотриен  $B_4$ ), хемокины (CXCL1-CXCL3 и CXCL5-CXCL8), формилированные пептиды (например, N-формилметионил-лейцил-фенилаланин) и анафилотоксины (ферменты системы комплемента, C3a и C5a) [12]. Процесс привлечения нейтрофилов был назван экстравазацией и включает ряд последовательных стадий, таких как опосредованный селектинами роллинг, прочную адгезию, внутрисосудистую и затем трансэндотелиальную миграцию, отделение от стенки сосуда и миграцию внутрь ткани [12]. В очаге воспаления нейтрофилы осуществляют такие эффекторные функции, как фагоцитоз и/или дегрануляцию (рис. 1). Кроме того, после сборки и активации ферментного комплекса НАДФН-оксидазы на плазматической и гранулярной мембранах нейтрофилы генерируют АФК ( $O_2^-$ ,  $HO^+$ ,  $H_2O_2$ ) [13, 14].  $H_2O_2$  далее конвертируется в гипохлорную кислоту (HClO) при участии миелопероксидазы.

В 2004 г. в лаборатории Артуро Циклински [1] было обнаружено, что нейтрофилы могут убивать патогены вне клеток, выбрасывая так называемые NET. А поскольку в процессе образования NET нейтрофилы утрачивают свою жизнеспособность, то в 2007 г. Стейнберг и Гринштейн [15] назвали такую форму клеточной гибели нейтрофилов NETозом. Было показано, что бактерицидность ловушек связана с их уникальным составом, включающим деконденсированный хроматин, «декорированный» бактерицидными белками гранул, ядра и цитоплазмы.

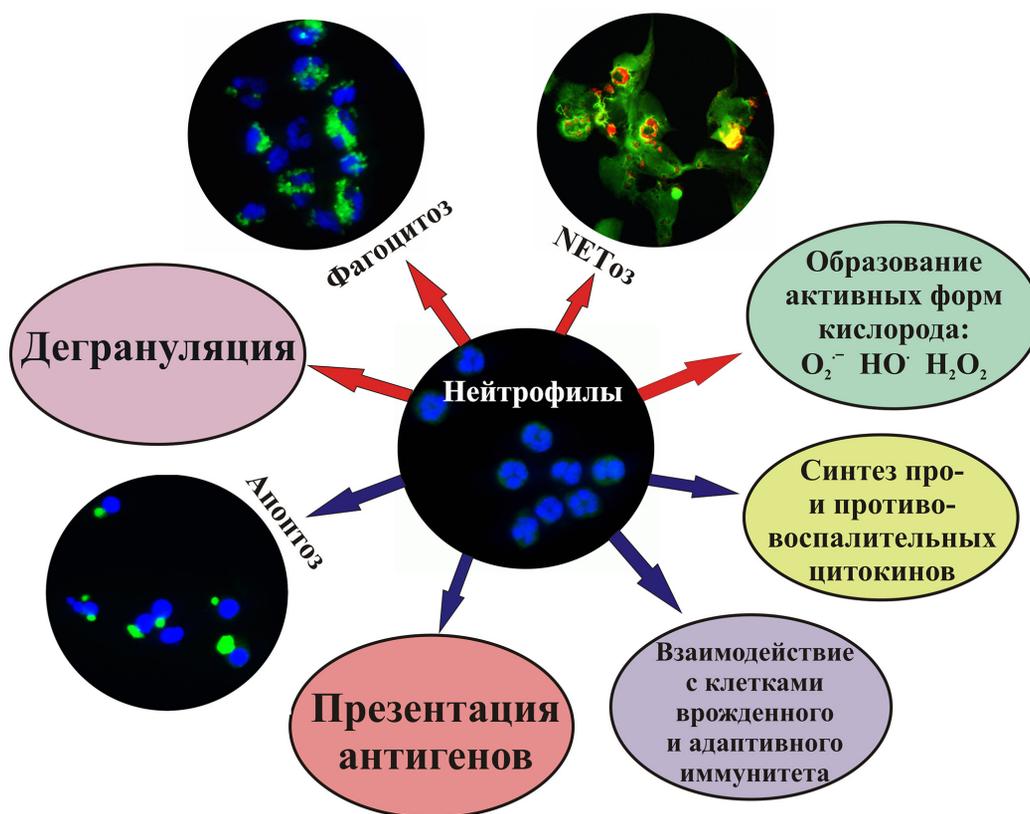
Образование NET может быть индуцировано большим количеством разнообразных физиологических стимулов, таких как бактерии, грибы, простейшие, вирусы и компоненты бактериальной клеточной стенки (липополисахариды). NET могут индуцировать антитела и иммунные комплексы, цитокины и хемокины (ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ ), микрокристаллы, кальциевые и калиевые ионофоры, а также такие фармакологические стимулы, как форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) [16–18]. Однако впоследствии было обнаружено, что, помимо защитной функции, NET играют важную роль в патогенезе аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний [16, 17, 19].

Кроме осуществления основных эффекторных функций, нейтрофилы способны синтезировать ряд противо- и провоспалительных цитокинов [20] (рис. 1). Помимо этого, апоптоз нейтрофилов и их последующее поглощение макрофагами (эффероцитоз) инициируют продукцию цитокинов и факторов роста, способствующих репарации ткани [21].

Нейтрофилы обладают способностью взаимодействовать с другими клетками врожденного иммунитета. Было показано, что активированные нейтрофилы выделяют ферменты и цитотоксиче-

ские вещества, а также хемокины и цитокины, способные привлечь незрелые ДК, моноциты и макрофаги [22] (рис. 1).

Нейтрофилы могут взаимодействовать с компонентами адаптивной иммунной системы, связывая иммуноглобулины IgG- и IgA-классов на поверхности опсонизированных микроорганизмов [23]. Нейтрофилы также обладают способностью осуществлять функцию хелперов для В-лимфоцитов. Это происходит, когда они получают сигналы репрограммирования от синусоидальных эндотелиальных клеток в маргинальной зоне селезенки, стимулирующих их к образованию NET-подобных структур и к синтезу цитокинов, активирующих В-лимфоциты. Эти цитокины способствуют переключению синтеза иммуноглобулинов на IgG-класса, соматическим гипермутациям и продукции антител [24]. Кроме того, было установлено прямое взаимодействие нейтрофилов с Т-лимфоцитами [25]. Наконец, было обнаружено, что при определенных условиях нейтрофилы выступают как антигенпрезентирующие клетки (АПК) [26], хотя механизм презентации антигенов нейтрофилами изучен недостаточно. В настоящем обзоре суммированы результаты исследований, посвященных действию нейтрофилов как АПК.



**Рис. 1.** Эффекторные и другие функции нейтрофилов

В очаге воспаления нейтрофилы осуществляют такие эффекторные функции как фагоцитоз, дегрануляция, образование активных форм кислорода и выброс нейтрофильных внеклеточных ловушек – NETоз (указано красными стрелками).

Нейтрофилы способны синтезировать ряд противо- и провоспалительных цитокинов, взаимодействовать с другими клетками врожденного и адаптивного иммунитета, а также при определенных условиях выполнять функции антигенпрезентирующих клеток (указано синими стрелками).

## 2. Свойства профессиональных АПК

Три типа клеток иммунной системы относятся к профессиональным АПК: ДК, В-лимфоциты и моноциты/макрофаги, которые характеризуются конститутивной экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) класса I и II. Все остальные клетки экспрессируют на своей поверхности только МНС-I и представляют антигены CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам.

Для презентации антигена АПК должны обладать способностью захватывать и процессировать (осуществлять фрагментацию и другие превращения антигена с целью его последующего представления Т-лимфоцитам) его до пептидов, а также иметь вспомогательные молекулы, позволяющие им взаимодействовать с Т-лимфоцитами. Так называемая «трехсигнальная модель» [27] была предложена для описания антигенпрезентирующей функции, необходимой для активации Т-лимфоцитов. В соответствии с этой моделью, взаимодействие комплекса МНС-пептид с Т-клеточным рецептором (TCR, T-cell receptor) обеспечивает сигнал 1. Однако этого сигнала недостаточно и требуется сигнал 2, который инициируется в результате взаимодействия костимулирующих молекул (например, CD80/86) с комплементарными молекулами (CD28) на Т-лимфоцитах. И, наконец, активированные АПК могут секретировать различные цитокины в качестве сигнала 3, который определяет дифференцировку CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в те или иные эффекторные клетки (например, Т-хелперы 1, Т-хелперы 2 или Т-хелперы 17). Чтобы стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов, типичные или профессиональные АПК должны обладать как минимум сигналами 1 и 2.

## 3. Нейтрофилы как АПК

Предположение, что нейтрофилы могут выполнять функцию АПК, базируется на их способности интернализировать антигены и экспрессировать при определенных условиях основной молекулярный аппарат для их презентации [28]. Однако существуют значительные различия в антигенпрезентирующих функциях нейтрофилов и типичных АПК. Так, было показано, что покоящиеся нейтрофилы не экспрессируют или проявляют очень низкую экспрессию МНС-II и не способны стимулировать пролиферацию наивных CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов при совместном культивировании [29] в отличие от типичных АПК. Следует отметить, что около 210–340 молекул МНС-II необходимы для осуществления антигенпрезентирующей функции профессиональными АПК [30].

Вместе с тем было установлено, что МНС-II и костимулирующие молекулы, тем не менее, могут быть индуцированы на поверхности нейтро-

филов при воздействии специфических цитокинов, например, ИФН- $\gamma$  или ГМ-КСФ [31]. Более того, было показано, что нейтрофилы, инкубированные в присутствии цитокинов, приобретают способность стимулировать Т-лимфоциты при участии молекул МНС-II [32]. Интересно, что как мышинные, так и человеческие нейтрофилы костного мозга, подвергшиеся воздействию ГМ-КСФ, дифференцировались в гибридные нейтрофилдендритные клетки. Такие гибриды обладали фенотипом ДК и антигенпрезентирующей функцией, сохраняя при этом некоторые свойства нейтрофилов [33]. При этом как незрелые, так и зрелые нейтрофилы мыши и человека могли трансформироваться в ДК-подобные клетки после воздействия на них таких цитокинов, как ГМ-КСФ, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4 и ФНО [34, 35]. Из этого следовало, что способность нейтрофилов трансформироваться в АПК не ограничена определенной стадией дифференцировки. Помимо способности нейтрофилов дифференцироваться в АПК при воздействии цитокинов в культурах, нейтрофилы пациентов, получающих терапию в виде ГМ-КСФ или ИФН- $\gamma$ , также обладали способностью экспрессировать МНС-II [36]. Кроме того, у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями, ассоциированными с высоким уровнем цитокинов, такими как ревматоидный артрит и гранулематоз Вегенера, также наблюдалась повышенная экспрессия МНС-II на нейтрофилах [37–39].

## 4. Антигенпрезентирующая функция нейтрофилов, индуцированная Т-лимфоцитами

Недавно было показано, что Т-лимфоциты могут индуцировать трансформацию нейтрофилов в АПК [40]. Так, свежее выделенные нейтрофилы человека, культивированные с Т-лимфоцитами, начинали экспрессировать маркеры АПК CD80 и CD86 [32]. Кроме того, нестимулированные нейтрофилы индуцировали пролиферацию антиген-специфических Т-лимфоцитов при совместном культивировании с Т-клетками и антигенами [32].

## 5. Регуляция индукции антигенпрезентирующей функции нейтрофилов

Несмотря на то, что классические молекулы, участвующие в презентации антигена, отсутствуют на поверхности покоящихся нейтрофилов, Сандилендс и соавт. [37] обнаружили молекулы CD80 и CD86 в секреторных везикулах и гранулах нормальных нейтрофилов человека (рис. 2). Молекулы МНС-II также были выявлены в цитозоле нейтрофилов, но только у 10% здоровых доноров [41]. Было показано, что МНС-II, CD80 и CD86 могут в течение нескольких минут перемещаться на клеточную поверхность после стимуляции нейтрофилов [37, 42].

Помимо внутриклеточного хранения маркеров АПК, был также показан синтез *de novo* моле-

кул МНС-II при воздействии такого цитокина, как ИФН-γ [43] (рис. 2).

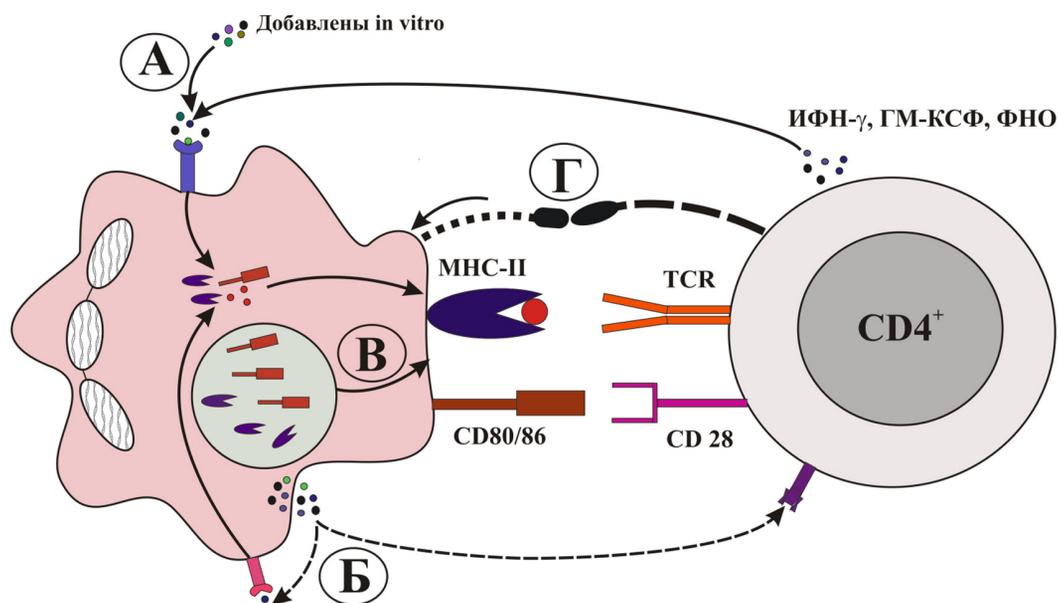
Как было сказано выше, нейтрофилы начинают функционировать как АПК после совместного культивирования с антигенами и Т-клетками памяти. Было показано, что подавление МНС-II на нейтрофилах отменяло их антигенпрезентирующую функцию [29, 32]. Однако каким образом Т-клетки памяти стимулируют экспрессию МНС-II на поверхности нейтрофилов, до сих пор не выяснено.

Недавно было установлено, что свежeweдeленные нейтрофилы человека могли представлять белковые антигены (pp65-специфический гемагглютинин цитомегаловируса) аутологичным антиген-специфическим Т-лимфоцитам CD4<sup>+</sup> [29]. Для экспрессии МНС-II и костимулирующих молекул на нейтрофилах в этой системе требовалось присутствие как антиген-специфических Т-клеток памяти, так и специфических антигенов. Хотя можно было бы предположить, что антигены сами по себе индуцируют трансформацию нейтрофилов в АПК, это представляется маловероятным, поскольку совместное культивирование нейтрофилов с антигенами или агонистами TLR не приводило к повышению экспрессии МНС-II на их поверхности [29]. Было высказано предположение, что индукция антигенпрезентирующей функции нейтрофилов в присутствии Т-лимфоцитов происходит в результате образования межклеточных

контактов или секреции специфических медиаторов. Потенциальным цитокином, синтезируемым Т-лимфоцитами и способным вызвать подобную дифференцировку нейтрофилов, мог бы быть ИФН-γ [40]. Как уже упоминалось, антигенпрезентирующая функция нейтрофилов индуцируется исключительно антиген-специфическими Т-клетками памяти, а не наивными Т-клетками. Возможно, это связано с тем, что Т-клетки памяти продуцируют ИФН-γ значительно быстрее и в больших количествах. Кроме того, у Т-клеток памяти существуют менее строгие требования к активации, чем у наивных Т-клеток. Например, известно, что для них требуется гораздо меньше костимулирующих сигналов [44]. Кроме того, Т-клетки памяти не являются полностью покоящимися клетками, особенно в очагах воспаления или в присутствии постоянных стимулов в их микроокружении.

Интересно, что в покоящихся нейтрофилах человека была обнаружена мРНК для ИФН-γ [41], а также постоянный запас белков ИФН-γ, который мог спонтанно высвободиться в процессе стимуляции [45]. Таким образом, вероятно, нейтрофилы могут сами себя активировать аутокринным способом с помощью ИФН-γ (рис. 2).

Вместе с тем, было высказано предположение, что прямого межклеточного контакта между Т-лимфоцитами и нейтрофилами достаточно для индукции антигенпрезентирующей функции ней-



**Рис. 2.** Возможные механизмы активации антигенпрезентирующей функции нейтрофилов

Нейтрофилы могут синтезировать МНС-II и костимулирующие молекулы *de novo* при стимуляции экзогенными цитокинами (ИФН-γ, ГМ-КСФ, ФНО), синтезированными Т-лимфоцитами или добавленными *in vitro* (А). Цитокины, синтезированные в самих нейтрофилах, могут аутокринным способом активировать клетки и индуцировать механизм презентации антигена (Б). Нейтрофилы содержат внутриклеточные запасы МНС-II и костимулирующих молекул, которые могут перемещаться на поверхность клетки после стимуляции (В). Специфические рецепторы, экспрессируемые на мембранах нейтрофилов и Т-лимфоцитов, могут обеспечивать межклеточный контакт и усиливать дифференцировку нейтрофилов в АПК (Г).

Сокращения: МНС, главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); CD80/86, костимулирующие молекулы на поверхности нейтрофила; TCR, Т-клеточный рецептор (T-cell receptor); ИФН-γ, интерферон гамма; ГМ-КСФ, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ФНО, фактор некроза опухоли.

трофилов. Как недавно было показано на модели мышинных нейтрофилов, экспрессия МНС-II подавлялась, если нейтрофилы и Т-лимфоциты разделяли в «Системе Transwell» [46]. Однако молекулы, участвующие в межклеточных контактах Т-лимфоцитов с нейтрофилами, в настоящее время не определены. Предполагают, что ими могут быть классические костимулирующие молекулы, способствующие образованию иммунологического синапса (рис. 2). Как и в случае с синтезом ИФН- $\gamma$ , Т-клетки памяти экспрессируют более высокие уровни ряда рецепторов, сравнительно с наивными Т-лимфоцитами, чем можно было бы объяснить неспособность наивных Т-клеток индуцировать трансформацию нейтрофилов в АПК. Например, Т-клетки памяти экспрессируют более высокие уровни молекул межклеточной адгезии I (ICAM-1) по сравнению с наивными Т-клетками. Кроме того, маркер CD66b, конститутивно экспрессируемый исключительно в нейтрофилах, может функционировать как рецептор галектина-3, который также конститутивно экспрессируется человеческими CD4<sup>+</sup>-Т-клетками и только на низком уровне – наивными Т-клетками [47]. Таким образом, вышеупомянутые взаимодействия между Т-клетками памяти и нейтрофилами могут обеспечивать необходимые сигналы для инициации экспрессии МНС-II на поверхности фагоцитов.

Сигнальный путь, обеспечивающий процессинг антигенов в нейтрофилах, до конца не изучен, и могут быть существенные различия этого процесса у классических и атипичных АПК. Инвариантная цепь Ii (Invariant chain), ассоциированная с МНС-II и являющаяся одним из ключевых компонентов, необходимых для регуляции связывания пептидов с МНС-II во время процессинга антигена, не была обнаружена в нейтрофилах [48]. Однако было показано, что катепсин S, лизосомальный фермент, участвующий в расщеплении Ii, все же экспрессируется в нейтрофилах [49]. Следует также отметить, что созревание фагосом в нейтрофилах и классических АПК (например, макрофагах) во многих отношениях сильно различается [50, 51]. Помимо молекулярных механизмов, типы антигенов, которые способны представлять нейтрофилы и классические АПК, также различаются. Было показано, что нейтрофилы могут представлять растворимые белковые или пептидные антигены CD4<sup>+</sup>-Т-клеткам [29]. Однако крайне мало данных о презентации нейтрофилами корпускулярных антигенов или иммунных комплексов, например, целых микроорганизмов, вирусом или антигенов, конъюгированных с наночастицами при участии МНС-II.

Кроме представления нейтрофилами классических антигенов в составе МНС-II, были получены данные об их способности к перекрестной презентации [52]. Перекрестная презентация представляет собой способность профессиональ-

ных АПК представлять экзогенные антигены CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам. Так, было установлено, что как мышинные, так и человеческие нейтрофилы перекрестно представляют экзогенные антигены CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам в системах *in vivo* и *in vitro* [53, 54]. Кроме того, нейтрофилы, выделенные из крови пациентов с сепсисом в острой форме, были способны перекрестно представлять антигены CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам [55]. Недавно было также показано, что инфильтрующие опухоль нейтрофилы, выделенные от пациентов с раком легкого, перекрестно представляли опухолевые антигены и стимулировали противоопухолевые Т-клеточные ответы [56]. Таким образом, способность к перекрестной презентации антигенов также может индуцироваться в нейтрофилах при определенных условиях и способствовать поддержанию Т-клеточного ответа.

#### 6. Физиологическое значение антигенпрезентирующей функции нейтрофилов

Хотя антигенпрезентирующая функция нейтрофилов была установлена экспериментально, ее роль в естественных условиях до конца неизвестна. Вполне очевидно, что при определенных обстоятельствах, например, в присутствии высоких концентраций цитокинов или при воспалении, в нейтрофилах могут экспрессироваться молекулы, необходимые для презентации антигенов. Например, было показано, что МНС-II экспрессируются на поверхности нейтрофилов пациентов с гранулематозом Вегенера и ревматоидным артритом [35, 38]. А поскольку aberrантная экспрессия МНС-II была ассоциирована с прогрессом этих аутоиммунных заболеваний, есть вероятность, что нейтрофилы играют важную роль в их патогенезе благодаря презентации аутоантигенов [52].

Была также описана инфильтрация нейтрофилов в очаг воспаления и их последующая быстрая миграция во вторичные лимфоидные органы (дренирующие лимфатические узлы, дЛУ) [57]. Интересно, что у мышей, иммунизированных вакциной БЦЖ (сокращение от Бацилла Кальметта-Герёна), преимущественно нейтрофилы фагоцитировали вакцину в местах инъекции и затем транспортировали ее в Т-клеточные зоны в дЛУ [58]. Миграция нейтрофилов, несущих антиген, из периферических участков в дЛУ, может вносить существенный вклад в стимуляцию Т-лимфоцитов. Это предположение было подтверждено результатами вакцинации приматов, у которых нейтрофилы представляли наибольшую популяцию клеток, интернализовавших вакцинные антигены как в месте инъекции, так и в дЛУ [29, 59]. Таким образом, вакцина-положительные нейтрофилы могли представлять антиген CD4<sup>+</sup>-Т-клеткам памяти в дЛУ, и в целом вклад нейтрофилов может быть существенным благодаря их огромному количеству.

## 7. Заключение

Таким образом, нейтрофилы – не просто короткоживущие терминально дифференцированные клетки, обеспечивающие первую линию защиты от патогенов. Эти клетки могут представлять антигены при определенных условиях и активировать адаптивный иммунитет. Однако молекулярный механизм презентации антигенов нейтрофилами изучен недостаточно. Понимание вклада нейтрофилов в активацию адаптивного иммунитета через презентацию антигенов может способствовать переоценке их роли в патогенезе аутоиммунных и воспалительных заболеваний,

а также разработке новых вакцин и терапевтических средств для профилактики ряда инфекционных болезней.

Работа выполнена в рамках проекта «Молекулярные и клеточные основы иммунитета» (проект 21-1-21, номер ЦИТИС 121042600047-9) и Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–1535.
2. Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007;28(8):340–345.
3. Price T.H., Chatta G.S., Dale D.C. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood*. 1996;88(1):335–340.
4. Galli S.J., Borregaard N., Wynn T.A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 2011;12(11):1035–1044.
5. Dancy J.T., Deubelbeiss K.A., Harker L.A., Finch C.A. Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.* 1976;58(3):705–715.
6. Martin C., Burdon P.C., Bridger G., Gutierrez-Ramos J.C., Williams T.J., Rankin S.M. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19(4):583–593.
7. Westman J., Grinstein S., Marques P.E. Phagocytosis of necrotic debris at sites of injury and inflammation. *Front. Immunol.* 2020;10:3030.
8. Dalli J., Montero-Melendez T., Norling L.V., Yin X., Hinds C., Haskard D., Mayr M., Perretti M. Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties. *Mol. Cell. Proteomics*. 2013;12(8):2205–2219.
9. Polak D., Hafner C., Briza P., Kitzmüller C., Elbe-Bürger A., Samadi N., Gschwandner M., Pfützner W., Zlabinger G.J., Jahn-Schmid B., Bohle B. A novel role for neutrophils in IgE-mediated allergy: Evidence for antigen presentation in late-phase reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019;143(3):1143–1152.e4.
10. Oehler L., Majdic O., Pickl W.F., Stöckl J., Riedl E., Drach J., Rappersberger K., Geissler K., Knapp W. Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J. Exp. Med.* 1998;187(7):1019–1028.
11. Hayashi F., Means T.K., Luster A.D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102(7):2660–2669.
12. Metzmaekers M., Gouwy M., Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell. Mol. Immunol.* 2020;17(5):433–450.
13. Nauseef W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* 2007;219(1):88–102.
14. Liew P.X., Kubes P. The neutrophil's role during health and disease. *Physiol. Rev.* 2019;99(2):1223–1248.
15. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE*. 2007;2007(379):pe11.
16. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: Molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(10):1178–1190.
17. Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: New aspects. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020;75(4):173–188.
18. Vorobjeva N., Dagil Y., Pashenkov M., Pinegin B., Chernyak B. Protein kinase C isoforms mediate the formation of neutrophil extracellular traps. *Int. Immunopharmacol.* 2023;114: 109448.
19. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2015;14(7):633–640.
20. Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M.A. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front. Immunol.* 2014;5:508.
21. Robertson A.L., Holmes G.R., Bojarczuk A.N., et al. A zebrafish compound screen reveals modulation of neutrophil reverse migration as an anti-inflammatory mechanism. *Sci. Transl. Med.* 2014;6(225):225ra29.
22. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014;124(5):710–719.
23. Tsuboi N., Asano K., Lauterbach M., Mayadas T.N. Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity*. 2008;28(6):833–846.
24. Puga I., Cols M., Barra C.M., et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* 2011;13(2):170–180.
25. Pelletier M., Maggi L., Micheletti A., Lazzeri E., Tamassia N., Costantini C., Cosmi L., Lunardi C., Annunziato F., Romagnani S., Cassatella M.A. Evidence for

- a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2010;115(2):335–343.
26. Kambayashi T., Laufer T.M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(11):719–730.
27. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(6):476–483.
28. Takashima A., Yao Y. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J. Leukoc. Biol.* 2015;98(4):489–496.
29. Vono M., Lin A., Norrby-Teglund A., Koup R.A., Liang F., Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro* and *ex vivo*. *Blood*. 2017;129(14):1991–2001.
30. Harding C.V., Unanue E.R. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature*. 1990;346(6284):574–576.
31. Gosselin E.J., Wardwell K., Rigby W.F., Guyre P.M. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN- $\gamma$ , and IL-3. *J. Immunol.* 1993;151(3):1482–1490.
32. Radsak M., Iking-Konert C., Stegmaier S., Andrassy K., Hänsch G.M. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*. 2000;101(4):521–530.
33. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*. 2013;121(10):1677–1689.
34. Oehler L., Majdic O., Pickl W.F., Stöckl J., Riedl E., Drach J., Rappersberger K., Geissler K., Knapp W. Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J. Exp. Med.* 1998;187(7):1019–1028.
35. Iking-Konert C., Csekö C., Wagner C., Stegmaier S., Andrassy K., Hänsch G.M. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J. Mol. Med. (Berl.)*. 2001;79(8):464–474.
36. Spagnoli G.C., Juretic A., Rosso R., Van Bree J., Harder F., Heberer M. Expression of HLA-DR in granulocytes of polytraumatized patients treated with recombinant human granulocyte macrophage-colony-stimulating factor. *Hum. Immunol.* 1995;43(1):45–50.
37. Sandilands G.P., McCrae J., Hill K., Perry M., Baxter D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on *in vitro* and *in vivo* activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology*. 2006;119(4):562–571.
38. Cross A., Bucknall R.C., Cassatella M.A., Edwards S.W., Moots R.J. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(10):2796–2806.
39. Iking-Konert C., Vogt S., Radsak M., Wagner C., Hänsch G.M., Andrassy K. Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Int.* 2001;60(6):2247–2262.
40. Müller I., Munder M., Kropf P., Hänsch G.M. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol.* 2009;30(11):522–530.
41. Sandilands G.P., Hauffe B., Loudon E., Marsh A.G., Gondowidjojo A., Campbell C., Ferrier R.K., Rodie M.E. Detection of cytoplasmic CD antigens within normal human peripheral blood leucocytes. *Immunology*. 2003;108(3):329–337.
42. Sandilands G.P., Ahmed Z., Perry N., Davison M., Lupton A., Young B. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology*. 2005;114(3):354–368.
43. van den Elsen P.J. Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. *Front. Immunol.* 2011;2:48.
44. Berard M., Tough D.F. Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology*. 2002;106(2):127–138.
45. Ethuin F., Gérard B., Benna J.E., Boutten A., Gougereot-Pocidallo M.A., Jacob L., Chollet-Martin S. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab. Invest.* 2004;84(10):1363–1371.
46. Abi Abdallah D.S., Egan C.E., Butcher B.A., Denkers E.Y. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int. Immunol.* 2011;23(5):317–326.
47. Feuk-Lagerstedt E., Jordan E.T., Leffler H., Dahlgren C., Karlsson A. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J. Immunol.* 1999;163(10):5592–5598.
48. Pantouris G., Syed M.A., Fan C., Rajasekaran D., Cho T.Y., Rosenberg E.M. Jr., Bucala R., Bhandari V., Lolis E.J. An analysis of MIF structural features that control functional activation of CD74. *Chem. Biol.* 2015;22(9):1197–1205.
49. Tato M., Kumar S.V., Liu Y., Mulay S.R., Moll S., Popper B., Eberhard J.N., Thomasova D., Rufer A.C., Gruner S., Haap W., Hartmann G., Anders H.J. Cathepsin S inhibition combines control of systemic and peripheral pathomechanisms of autoimmune tissue injury. *Sci. Rep.* 2017;7(1):2775.
50. Nordenfelt P., Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2011;90(2):271–284.
51. Воробьева H.B. Молекулярные механизмы фагоцитоза. Часть I. *Рос. иммунол. журн.* 2014;8(2):107–120.
52. Fernando M.M., Stevens C.R., Walsh E.C., De Jager P.L., Goyette P., Plenge R.M., Vyse T.J., Rioux J.D. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet.* 2008;4(4):e1000024.
53. Potter N.S., Harding C.V. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J. Immunol.* 2001;167(5):2538–2546.
54. Beauvillain C., Delneste Y., Scotet M., Peres A., Gascan H., Guernonprez P., Barnaba V., Jeannin P. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells *in vivo*. *Blood*. 2007;110(8):2965–2973.
55. Davey M.S., Morgan M.P., Liuzzi A.R., Tyler C.J., Khan M.W.A., Szakmany T., Hall J.E., Moser B., Eberl M. Microbe-specific unconventional T cells induce human neutrophil differentiation into antigen cross-presenting cells. *J. Immunol.* 2014;193(7):3704–3716.

56. Singhal S., Bhojnarwala P.S., O'Brien S., Moon E.K., Garfall A.L., Rao A.S., Quatromoni J.G., Stephen T.L., Litzky L., Deshpande C., Feldman M.D., Hancock W.W., Conejo-Garcia J.R., Albelda S.M., Eruslanov E.B. Origin and role of a subset of tumor-associated neutrophils with antigen-presenting cell features in early-stage human lung cancer. *Cancer Cell*. 2016;30(1):120–135.
57. Hampton H.R., Chtanova T. The lymph node neutrophil. *Semin. Immunol.* 2016;28(2):129–136.
58. Abadie V., Badell E., Douillard P., Ensergueix D., Leenen P.J., Tanguy M., Fiette L., Saeland S., Gicquel B., Winter N. Neutrophils rapidly migrate *via* lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*. 2005;106(5):1843–1850.
59. Liang F., Lindgren G., Sandgren K.J., Thompson E.A., Francica J.R., Seubert A., De Gregorio E., Barnett S., O'Hagan D.T., Sullivan N.J., Koup R.A., Seder R.A., Loré K. Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Sci. Transl. Med.* 2017;9(393):eaal2094.

Поступила в редакцию 05.04.2023

После доработки 22.05.2023

Принята в печать 29.05.2023

## REVIEW

# Neutrophils are atypical antigen-presenting cells

N.V. Vorobjeva 

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

Neutrophils are the most abundant leukocytes in the blood and the “first line” of defense against pathogens in the inflammation foci, where they perform effector functions such as phagocytosis, degranulation, generation of reactive oxygen species, and the formation of neutrophil extracellular traps. For a long time, it was believed that neutrophils are short-lived terminally differentiated phagocytes. However, this point of view has been changed after it was found that these cells are able to interact with other populations of leukocytes, as well as mediate the relationship between innate and adaptive immunity. In recent years, a lot of data has accumulated indicating the ability of neutrophils to acquire the function of antigen-presenting cells in a number of pathological and inflammatory conditions. In addition, neutrophils can express major histocompatibility complex class II and costimulatory molecules under the influence of specific cytokines in the *in vitro* system and activate T lymphocytes. This review summarizes current data on the antigen-presenting function of neutrophils, the proposed mechanisms of regulation of this process and its significance in normal and pathological conditions.

**Keywords:** *neutrophil, antigen-presenting cell, antigen presentation, major histocompatibility complex, cytokines, chemokines*

**Funding:** The research was carried out within the framework of the project “Molecular and cellular bases of immunity” (number 21-1-21, CITIS number 121042600047-9) and Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology.”

## Сведения об авторе

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

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.32

## Адаптация зеленых фотосинтезирующих бактерий к разной освещенности по данным спектроскопии хлоросом

А.Г. Яковлев\* , А.С. Таисова, З.Г. Фетисова

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

\*e-mail: yakov@belozersky.msu.ru

Исследовали спектры поглощения и кругового дихроизма хлоросом, выделенных из зеленых фотосинтезирующих бактерий *Chloroflexus aurantiacus*, выращенных при разной освещенности. Обнаружили, что по мере уменьшения этой освещенности спектры сдвигаются в красную сторону и становятся уже и больше по амплитуде. Выполнили теоретическое моделирование полученных данных с помощью теории экситонов. Пришли к выводу о том, что количество молекул бактериохлорофилла *c* в линейных цепях, составляющих основу элементарных блоков хлоросом, становится больше по мере уменьшения интенсивности света, при котором выращиваются бактерии. Предположили, что данное явление увеличивает эффективность улавливания слабых световых потоков и тем самым повышает шансы на выживание бактерий в условиях дефицита солнечного света.

**Ключевые слова:** фотосинтез, зеленые бактерии *Chloroflexus aurantiacus*, хлоросома, спектроскопия, освещенность, адаптация

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

Фотосинтез растений, водорослей и бактерий является основой жизни на Земле, создавая устойчивые химические соединения с помощью энергии солнечного света. Этот глобальный сложный процесс начинается с поглощения квантов света различными светособирающими комплексами. В зеленых бактериях такими комплексами являются хлоросомы, состоящие из  $10^4$ – $10^5$  молекул бактериохлорофилла (БХл) *c/d/e* [1, 2]. Огромный размер хлоросом позволяет бактериям улавливать очень слабые световые потоки. Соседние молекулы БХл хлоросом притягиваются друг к другу за счет водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса. Это притяжение приводит к олигомеризации БХл и образованию сложных пространственных структур, основу которых составляют квазилинейные цепи БХл [3–5]. Детальное строение хлоросом до сих пор не изучено до конца, однако в ряде работ показано, что линейные цепи БХл могут объединяться в полые цилиндрические структуры [6–9], цилиндрические рулоны [10], полуцилиндры или воронкообразные структуры [11], изогнутые плоскости [12, 13]. При поглощении света в олигомерах БХл образуются экситоны, которые мигрируют по хлоросоме и через несколько пикосекунд начинают проникать в мембранные структуры, непосредственно примыкающие к реакционному

центру [14–16]. В нем происходит первичное разделение зарядов, энергия которых используется в дальнейшей цепи биохимических превращений. Показано, что зеленые бактерии реагируют на изменение интенсивности света, увеличивая размеры хлоросом при его уменьшении, и наоборот [1, 17, 18]. В нашей работе мы выясняли, как влияет изменение интенсивности света, при котором культивируются зеленые бактерии *Chloroflexus aurantiacus*, на структуру их хлоросом. Для этого мы использовали стационарную спектроскопию поглощения и кругового дихроизма, а также теоретическое моделирование спектров. Оказалось, что не только размеры, но и структура хлоросом весьма чувствительны к изменениям интенсивности света. Увеличение размеров элементарных блоков хлоросом бактерий, выращенных на слабом свете, минимизирует снижение эффективности переноса энергии, неизбежное при увеличении общего размера хлоросом.

### Материалы и методы

Культуры зеленой бактерии *C. aurantiacus* (штамм Ok-70-fl) выращивали в анаэробных условиях при 55°C на стандартной среде [17] при постоянном перемешивании и двух разных интенсивностях света: низкой ( $3 \text{ мкЭ/м}^2\text{с}$ ) и высокой

(60 мкЭ/м<sup>2</sup>с). В качестве источника света применяли лампы накаливания с вольфрамовой нитью. Световой поток варьировали изменением количества ламп, а также расстояния между лампами и емкостью с бактериальной культурой. Выделение хлоросом из клеток проводили, как описано ранее [19]. Свежие клетки осаждали из культуральной среды центрифугированием при 10000 г в течение 20 мин, двукратно промывали 10 мМ Трис-НСl-буфером (рН 8,0) и ресуспендировали в 20 мл 50 мМ Трис-НСl-буфера, содержащего 2 М тиоцианата натрия и 10 мМ аскорбата натрия (ТТА-буфер). Клетки гомогенизировали, добавляли кристаллическую ДНКазу (Sigma, Германия) до концентрации 50 мкг/мл и 100 мМ MgCl<sub>2</sub> · 6 Н<sub>2</sub>O до 2 мМ. Суспензию инкубировали 15 мин в темноте при 4°C. Затем клетки разрушали путем трехкратного пропускания через пресс Френча при 20000 пси. После добавления этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), рН 7,0, до конечной концентрации 2 мМ, суспензию разрушенных клеток инкубировали 30 мин при слабом перемешивании в темноте при 4°C. Неразрушенные клетки и большие клеточные обломки отделяли центрифугированием при 20000 г в течение 25 мин. Полученный супернатант доводили до 24 мл ТТА-буфером и добавляли Triton-X100 до конечной концентрации 0,05 % (m/v). Непрерывный градиент сахарозы (от 55% до 20% m/v) в ТТА-буфере готовили непосредственно в центрифужных стаканчиках. На каждый градиент сахарозы наносили по 4 мл супернатанта. После центрифугирования в течение 20 ч при 135000 г при 4°C фракцию хлоросом отбирали в области 28–30% градиента сахарозы. Спектры поглощения хлоросом измеряли с помощью спектрофотометра Hitachi-557 (Hitachi, Япония). Спектры кругового дихроизма измеряли с помощью спектрометра Марк III (Jobin Ivon, Франция).

Теоретическое моделирование проводили в рамках стандартной теории экситонов [20] и цилиндрической модели элементарных блоков хлоросом [21, 22]. Энергия  $E_{ij}$  и дипольный момент  $D_{ij}$  экситонного состояния с индексами  $i, j$  вычислялись следующим образом (жирным шрифтом в формулах 1–6 обозначены векторы):

$$E_{ij} = E_0 + 2E_1 \cos \frac{i\pi}{N+1} + 2E_2 \cos \frac{j2\pi}{L}, \quad (1)$$

$$D_{ij} = \sum \sum C_{ki} C_{lj} d_{kl}, \quad (2)$$

$$i = 1, 2, \dots, N,$$

$$j = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, L,$$

здесь электронная энергия мономера БХл с  $E_0 = 15083 \text{ см}^{-1}$  (663 нм), энергия экситонного взаимодействия соседних молекул из одной цепи  $E_1 = -750 \text{ см}^{-1}$ , энергия взаимодействия соседних

цепей  $E_2 = -140 \text{ см}^{-1}$ ,  $d_{kl}$  – дипольный момент перехода молекулы с номером  $k$  из цепи с номером  $l$ ,  $N$  – число молекул в цепи,  $L$  – число цепей в цилиндрическом агрегате. Коэффициенты  $C_{ki}$  и  $C_{lj}$  вычислялись следующим образом:

$$C_{ki} = \left( \frac{2}{N+1} \right)^{0.5} \sin \frac{ki\pi}{N+1}, \quad (3)$$

$$C_{lj} = L^{-0.5} \exp \frac{Ilj2\pi}{L}, \quad I^2 = -1. \quad (4)$$

Спектр поглощения цилиндрического агрегата  $A$  находился суммированием экситонных полос:

$$A \sim \omega \sum_{ij} |D_{ij}|^2 \exp \left( -4 \ln 2 \left( \frac{\hbar\omega - E_{ij}}{\Gamma_{ij}} \right)^2 \right), \quad (5)$$

$$\frac{\Gamma_{ij}}{2} \sqrt{\ln 2} = 260 \text{ см}^{-1}$$

Компоненты спектра кругового дихроизма (КД) вычислялись так:

$$KД_{ij} \sim \omega \sum_{k>l}^{NL} C_{ki} C_{lj} R_{kl} \cdot [d_{ik} \times d_{jl}], \quad (6)$$

здесь  $R_{kl}$  – радиус-вектор между молекулами с номерами  $k$  и  $l$ . Зависимость коэффициента преломления от  $\omega$  не учитывалась. Ориентация дипольных моментов задавалась углом наклона к длинной оси цилиндра (35°) и углом между проекцией дипольного момента на поперечное сечение цилиндра и прямой, проведенной через центр этого сечения и данную молекулу (80°).

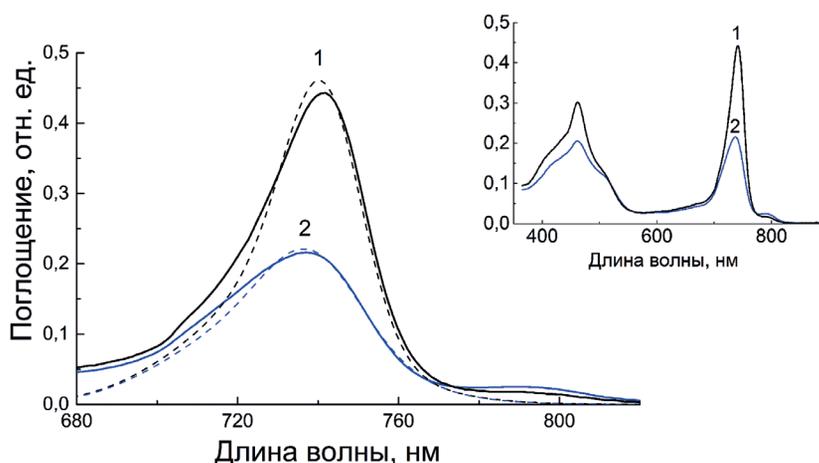
### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 показаны спектры поглощения хлоросом двух культур бактерий *S. aurantiacus*, выращенных на слабом (3 мкЭ/м<sup>2</sup>с) и сильном (60 мкЭ/м<sup>2</sup>с) свету. Оба спектра состоят из красной полосы Q<sub>y</sub> (центр при ~740 нм) и синей полосы Сорэ (центр при ~460 нм) молекул БХл с в агрегированном состоянии. Очень слабая полоса при 795 нм принадлежит переходу Q<sub>y</sub> мономерных молекул БХл а базовой пластинки, соединяющей хлоросому с цитоплазматической мембраной [1]. При уменьшении интенсивности света, при котором выращивались культуры бактерий, в 20 раз происходит сдвиг полосы Q<sub>y</sub> в красную сторону на несколько нанометров. Одновременно наблюдается увеличение амплитуды этой полосы более чем в 2 раза и ее небольшое сужение. На рис. 2 приведены спектры КД хлоросом двух культур бактерий *S. aurantiacus*, выращенных на слабом и сильном свету. Каждый спектр представляет собой разность спектров поглощения, измеренных с помощью левополяризованного и правополяризованного света. Форма спектров КД на рис. 2 характерна для олигомерных

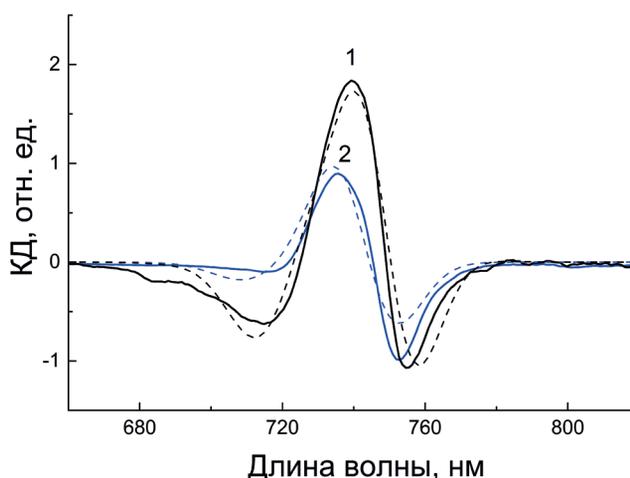
агрегатов молекул. Известно, что спектры КД очень чувствительны к структурным изменениям объектов. При уменьшении интенсивности света, при котором культивировались бактерии в 20 раз наблюдается общий сдвиг спектра КД в красную сторону и увеличение амплитуд его положительных и отрицательных полос.

При теоретическом моделировании полученных данных мы опирались на стандартную теорию экситонов [20] и цилиндрическую модель хлоросом [21, 22]. Согласно этой модели, хлоросома *S. aurantiacus* состоит из 10–20 полых цилиндров диаметром  $\sim 5$  нм и длиной  $\sim 100$  нм, образованных линейными цепями молекул БХл *c*. Каждый цилиндр, в свою очередь, представляет собой цепочку из 15–30 одинаковых коротких цилиндров (элементарных блоков) длиной  $\sim 6$  нм. Количество цепей молекул в цилиндрах и количество молекул

БХл *c* в каждой цепи являлись свободными параметрами, однако, исходя из размеров молекул и их общего числа в хлоросоме ( $\sim 10^4$ ), мы предположили, что каждый элементарный блок состоит из 6 цепей, а каждая цепь в этом блоке состоит из нескольких молекул. Для упрощения расчетов мы приняли, что размер области экситонного взаимодействия молекул равен размеру элементарного блока. В качестве иллюстрации на рис. 3 представлена схема элементарного блока хлоросомы *S. aurantiacus*, состоящего из 36 молекул БХл *c* ( $6 \times 6$ ). Для имитации структурного беспорядка мы предположили, что в ансамбле хлоросом имеются хлоросомы с разным количеством молекул в цепях. При моделировании спектров мы учитывали эффект гиперхромизма, который приводит к дополнительному усилению полосы  $Q_y$  за счет ослабления полосы  $Sor_z$  [23].



**Рис. 1.** Экспериментальные (сплошные линии) и теоретические (пунктир) спектры поглощения полосы  $Q_y$  хлоросом бактерий *S. aurantiacus*. Хлоросомы были выделены из культур, выращенных при интенсивности света  $3 \text{ мкЭ/м}^2\text{с}$  (1) и  $60 \text{ мкЭ/м}^2\text{с}$  (2). На врезке – полный спектр тех же хлоросом во всем видимом диапазоне. Теоретические спектры рассчитаны согласно цилиндрической модели хлоросом, элементарные блоки которых состоят из 6 линейных цепей по 3–6 (1) и 3–4 (2) молекул БХл *c* в каждой цепи. Подробности приведены в тексте.



**Рис. 2.** Экспериментальные (сплошные линии) и теоретические (пунктир) спектры кругового дихроизма (КД) полосы  $Q_y$  хлоросом бактерий *S. aurantiacus*. Хлоросомы были выделены из культур, выращенных при интенсивности света  $3 \text{ мкЭ/м}^2\text{с}$  (1) и  $60 \text{ мкЭ/м}^2\text{с}$  (2). Теоретические спектры рассчитаны согласно цилиндрической модели хлоросом, элементарные блоки которых состоят из 6 линейных цепей по 3–6 (1) и 3–4 (2) молекул БХл *c* в каждой цепи. Подробности приведены в тексте.

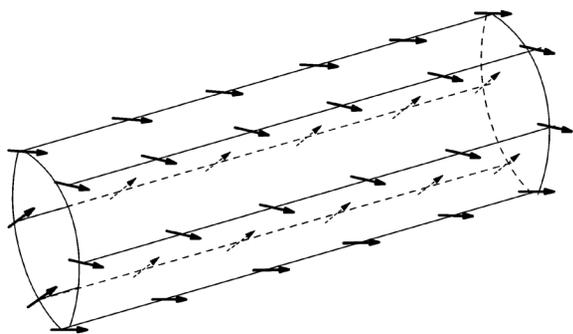


Рис. 3. Схема элементарного блока хлоросом, состоящего из 6 линейных цепей по 6 молекул БХл с в каждой цепи. Стрелками показаны векторы дипольных моментов переходов для полосы  $Q_y$ . Подробности приведены в тексте.

Результаты расчетов показаны пунктиром на рис. 1 (спектры поглощения) и рис. 2 (спектры КД). Теоретические спектры являются результатом сложения многих экситонных полос [22]. Гладкая форма спектров достигается за счет спектрального перекрытия этих полос. Хорошее совпадение теоретических и экспериментальных спектров хлоросом, полученных на сильном свете, получается, если в ансамбле имеется 60% хлоросом, элементарные цепи которых состоят из 3 молекул БХл с, и 40% хлоросом с 4 молекулами в каждой цепи. Среднее число молекул в элементарном блоке, состоящем из 6 одинаковых цепей, для такого ансамбля составит  $\sim 20$ . Для спектров хлоросом, выращенных на слабом свете, теория и эксперимент согласуются, если цепи молекул в ансамбле состоят из 6 (50%), 4 (20%) и 3 (30%) молекул БХл с. Для этого ансамбля среднее число молекул в элементарном блоке, состоящем из 6 цепей, составит  $\sim 28$ . Таким образом, уменьшение интенсивности света, при котором культивируются бактерии, приводит к увеличению доли бактерий с хлоросомами, состоящими из элементарных блоков с большим числом молекул. Именно увеличение среднего числа молекул в каждой элементарном блоке хлоросом от 20 до 28 приводит к сдвигу спектров поглощения и КД в красную сторону, а также к увеличению их амплитуды и некоторому уменьшению ширины. Причиной такой трансформации спектров является экситонное взаимодействие всех молекул в элементарном блоке, которое зависит от числа молекул, охваченных этим взаимодействием [20, 23]. Подчеркнем, что известное увеличение общего размера хлоросом при понижении освещенности [1, 5, 24, 25] не приведет к изменению спектров, если структура хлоросом останется неизменной. Отметим, что увеличение числа молекул в каждом элементарном блоке в 1,4 (28/20) раза в нашей работе не означает увеличения размеров всей хлоросомы в такое же число раз. Известно, что хлоросомы бактерий *C. aurantiacus*, выращенных на очень

сильном свете, имеют размеры  $12 \times 34 \times 96$  нм и содержат  $\sim 3400$  молекул БХл с, а хлоросомы, полученные на очень слабом свете, имеют размеры  $19 \times 38 \times 108$  нм и состоят из  $\sim 12000$  молекул БХл с [26]. Нетрудно подсчитать, что в первом случае каждая молекула БХл с занимает объем  $\sim 11,5$  нм<sup>3</sup>, а во втором случае этот объем составляет  $\sim 6,5$  нм<sup>3</sup>, то есть имеет место заметное уплотнение хлоросом.

Теоретически показано, что увеличение размеров светособирающей антенны при ее неизменной пространственной организации неизменно приводит к уменьшению квантового выхода переноса энергии, то есть эффективности функционирования, за счет увеличения потерь энергии [5, 21]. На качественном уровне понятно, что чем больше светособирающая антенна, тем больше среднее время, которое проводит экситон, мигрируя по антенне и теряя часть своей энергии каждую единицу времени. С другой стороны, увеличение размеров хлоросомы совершенно необходимо для улавливания слабых потоков света. Природа снимает это противоречие за счет увеличения размеров элементарного блока хлоросом и повышения плотности упаковки молекул. В результате эффективность переноса энергии в хлоросомах бактерий с очень разными размерами достигает 90% [5, 24, 25]. Отметим, что существуют и другие способы повышения эффективности работы хлоросом. Например, хлоросомы зеленой серной бактерии *Chlorobaculum tepidum* состоят из  $2,5 \times 10^5$  молекул БХл разных видов (c/d/e), что более чем на порядок больше, чем в хлоросоме *C. aurantiacus* [1]. Однако эффективность переноса энергии в хлоросомах *C. tepidum* так же высока, как и в хлоросомах меньшего размера других фотосинтезирующих бактерий. Совокупность различных экспериментальных и теоретических исследований этих рекордно больших хлоросом указывает на большое разнообразие структур агрегатов БХл в сочетании с очень плотной упаковкой молекул в каждом агрегате [11, 12, 27, 28]. Агрегаты БХл в хлоросомах *C. tepidum* могут иметь форму соосных цилиндров, вложенных один в другой, трехмерных спиралей различной формы или многослойных изогнутых плоскостей. Каждый агрегат может состоять из нескольких десятков квазилинейных цепей молекул БХл, а длина этих цепей может быть сравнима с размерами хлоросомы [29]. Гетерогенность форм агрегатов БХл может проявляться как между различными хлоросомами, так и внутри каждой хлоросомы. Спектроскопия одиночных хлоросом *C. tepidum* также указывает на значительную разницу их спектров, которая является следствием структурной гетерогенности [27, 30, 31]. Вероятно, именно структурное разнообразие хлоросом позволяет бактериям *C. tepidum* улавливать предельно слабые световые потоки, исчисляемые несколькими квантами

в час. Отметим, что зависимость степени агрегации молекул пигмента от интенсивности света присуща и другим видам фотосинтезирующих бактерий, которые не имеют хлоросом. Например, элементарный блок светособирающего комплекса LH-2 пурпурной бактерии *Rhodospseudomonas palustris* обычно состоит из одного мономера В-800 и одного димера В-850, однако на слабом свете количество агрегированных молекул БХл *a* в нем возрастает до 4 [32].

Таким образом, спектроскопия хлоросом, выделенных из зеленых фотосинтезирующих бактерий *S. aurantiacus*, показала зависимость спектров поглощения и кругового дихроизма от интенсивности света, при котором культивировались эти бактерии. Теоретическое моделирование показало, что экситонное взаимодействие молекул БХл *c* полностью объясняет полученные данные. Выяснилось, что количество молекул БХл *c* в линейных

цепях, составляющих основу элементарных блоков хлоросом, становится больше по мере уменьшения интенсивности света, при котором выращиваются бактерии. При этом увеличивается эффективность улавливания слабых световых потоков и тем самым повышаются шансы на выживание бактерий в условиях дефицита солнечного света. Данное явление отражает фундаментальную особенность живых организмов адаптироваться к изменению внешних условий.

Авторы благодарят А.М. Арутюняна за помощь в измерении спектров КД. Работа выполнена за счет средств госзадания «Фотобиофизика преобразования солнечной энергии в живых системах» (№ АААА-А17-117120540070-0). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oelze J., Golecki J. Membranes and chlorosomes of green bacteria: structure, composition and development. *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Eds. R.E. Blankenship, M.T. Madigan, and C.E. Bauer. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers; 1995:259–278.
- Frigaard N.-U., Bryant D. Chlorosomes: antenna organelles in green photosynthetic bacteria. *Complex intracellular structures in prokaryotes. Microbiology monographs, vol. 2*. Ed. J.M. Shively. Berlin: Springer; 2006. P. 79–114.
- Krasnovsky A., Bystrova M. Self-assembly of chlorophyll aggregated structures. *BioSystems*. 1980;12(3):181–194.
- Smith K., Kehres L., Fajer J. Aggregation of bacteriochlorophylls *c*, *d* or *e*. Models for the antenna chlorophylls of green and brown photosynthetic bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 1983;105(5):1387–1389.
- Фетисова З.Г., Фок М.В. Пути оптимизации преобразования световой энергии в первичных актах фотосинтеза. 1. Необходимость оптимизации структуры фотосинтетической единицы и метод расчета ее эффективности. *Мол. биол.* 1984;18(6):1354–1359.
- Staelin L., Golecki J., Fuller R., Drews G. Visualization of the supramolecular architecture of chlorosomes (*Chlorobium* type vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.* 1978;119(3):269–277.
- Sprague S., Staelin L., DiBartolomeis M., Fuller R. Isolation and development of chlorosomes in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.* 1981;147(3):1021–1031.
- Saga Y., Tamiaki H. Transmission electron microscopic study on supramolecular nanostructures of bacteriochlorophyll self-aggregates in chlorosomes of green photosynthetic bacteria. *J. Biosc. Bioeng.* 2006;102(2):18–23.
- Egawa A., Fujiwara T., Mizoguchi T., Kakitani Y., Koyama Y., Akutsu H. Structure of the light-harvesting bacteriochlorophyll *c* assembly in chlorosomes from *Chlorobium limicola* determined by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(3):790–795.
- Ganapathy S., Oostergetel G., Wawrzyniak P., Reus M., Gomez Maqueo Chew A., Buda F., Boekema E., Bryant D., Holzwarth A., de Groot H. Alternating syn-anti bacteriochlorophylls form concentric helical nanotubes in chlorosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106(21):8525–8530.
- Günther L., Jendry M., Bloemsma E., Tank M., Oostergetel G., Bryant D., Knoester J., Köhler J. Structure of light-harvesting aggregates in individual chlorosomes. *J. Phys. Chem. B*. 2016;120(24):5367–5376.
- Pšenčík J., Ikonen T., Laurinmäki P., Merckel M., Butcher S., Serimaa R., Tuma R. Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting system of green bacteria. *Biophys. J.* 2004;87(2):1165–1172.
- Pšenčík J., Torkkeli M., Zupčanová A., Vácha F., Serimaa R., Tuma R. The lamellar spacing in self-assembling bacteriochlorophyll aggregates is proportional to the length of the esterifying alcohol. *Photosynth. Res.* 2010;104(2):211–219.
- Van Dorssen R.J., Vasmel H., Amez J. Pigment organization and energy transfer in the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. II. The chlorosome. *Photosynth. Res.* 1986;9(1):33–45.
- Novoderezhkin V., Taisova A., Fetisova Z., Blankenship R., Savikhin S., Buck D., Struve W. Energy transfers in the B808-866 antenna from the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Biophys. J.* 1998;74(4):2069–2075.
- Linnanto J., Korppi-Tommola J. Exciton description of chlorosome to baseplate excitation energy transfer in filamentous anoxygenic phototrophs and green sulfur bacteria. *J. Phys. Chem. B*. 2013;117(38):11144–11161.
- Pierson B., Castenholz R. Studies of pigments and growth in *Chloroflexus aurantiacus*, a phototrophic filamentous bacterium. *Arch. Microbiol.* 1974;100(1):283–305.
- Schmidt K., Maarzahl M., Mayer F. Development and pigmentation of chlorosomes in *Chloroflexus aurantiacus* Ok-70-fl. *Arch. Microbiol.* 1980;127(2):87–97.
- Taisova A., Keppen O., Lukashev E., Arutyunyan A., Fetisova Z. Study of the chlorosomal antenna of the green mesophilic filamentous bacterium *Oscillochloris trichoides*. *Photosynth. Res.* 2002;74(1):73–85.
- Давыдов А.С. *Теория молекулярных экситонов*. М.: Наука; 1968: 296 с.

21. Fetisova Z., Freiberg A., Mauring K., Novoderezhkin V., Taisova A., Timpmann K. Excitation energy transfer in chlorosomes of green bacteria: Theoretical and experimental studies. *Biophys. J.* 1996;71(2):995–1010.
22. Mauring K., Novoderezhkin V., Taisova A., Fetisova Z. Exciton levels structure of antenna bacteriochlorophyll *c* aggregates in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus* as probed by 1.8–293 K fluorescence spectroscopy. *FEBS Lett.* 1999;456(2):239–242.
23. Gülen D. Significance of the excitonic intensity borrowing in the J-/H-aggregates of bacteriochlorophylls/chlorophylls. *Photosynth. Res.* 2006;87(2):205–214.
24. Oostergetel G., van Amerongen H., Boekema E. The chlorosome: a prototype for efficient light harvesting in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 2010;104(2):245–255.
25. Scholes G.D., Fleming G.R., Alexandra Olaya-Castro A., van Grondelle R. Lessons from nature about solar light harvesting. *Nat. Chem.* 2011;3(10):763–774.
26. Golecki J., Oelze J. Quantitative relationship between bacteriochlorophyll content, cytoplasmic membrane structure and chlorosome size in *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.* 1987;148(3):236–241.
27. Furumaki S., Vácha F., Habuchi S., Tsukatani Y., Bryant D., Vacha M. Absorption linear dichroism measured directly on a single light-harvesting system: the role of disorder in chlorosomes of green photosynthetic bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 2011;133(17):6703–6710.
28. Linnanto J., Korppi-Tommola J. Investigation on chlorosomal antenna geometries: tube, lamella and spiral-type self-aggregates. *Photosynth. Res.* 2008;96(3):227–245.
29. Prokhorenko V.I., Steensgaard D.B., Holzwarth A.R. Exciton dynamics in the chlorosomal antennae of the green bacteria *Chloroflexus aurantiacus* and *Chlorobium tepidum*. *Biophys. J.* 2000;79(4):2105–2120.
30. Furumaki S., Yabiku Y., Habuchi S., Tsukatani Y., Bryant D., Vacha M. Circular dichroism measured on single chlorosomal light-harvesting complexes of green photosynthetic bacteria. *J. Phys. Chem. Lett.* 2012;3(23):3545–3549.
31. Jendryny M., Aartsma T., Köhler J. Insights into the excitonic states of individual chlorosomes from *Chlorobaculum tepidum*. *Biophys. J.* 2014;106(9):1921–1927.
32. Hartigan N., Tharia H., Sweeney F., Lawless A., Papiz M. The 7.5-Å electron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH2 from *Rhodospirillum rubrum*. *Biophys. J.* 2002;82(2):963–977.

Поступила в редакцию 27.02.2023

После доработки 17.04.2023

Принята в печать 26.04.2023

## RESEARCH ARTICLE

# Adaptation of green photosynthetic bacteria to different illumination intensity according to spectroscopy data on chlorosomes

A.G. Yakovlev\* , A.S. Taisova, Z.G. Fetisova

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
1–40 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia  
\*e-mail: yakov@belozersky.msu.ru*

The absorption and circular dichroism spectra of chlorosomes isolated from green photosynthetic bacteria *Chloroflexus aurantiacus* grown under different illumination were studied. It was found that as the intensity of the growth light decreases, the spectra shift to the red side and become narrower and larger in amplitude. Theoretical modeling of the data obtained was performed using the theory of excitons. The conclusion was formulated that the number of bacteriochlorophyll *c* molecules in linear chains, which form the basis of the elementary blocks of chlorosomes, become greater as the intensity of light at which bacteria are grown decreases. It was suggested that this phenomenon increases the efficiency of capturing weak light fluxes and thereby increases the chances of bacterial survival in conditions of sunlight deficiency.

**Keywords:** *photosynthesis, green bacteria Chloroflexus aurantiacus, chlorosome, spectroscopy, illumination, adaptation*

**Funding:** The work was financed by the state contract of the Russian Federation № AAAA-A17-117120540070-0, “Photobiophysics of solar energy conversion in living systems.”

### Сведения об авторах

*Яковлев Андрей Георгиевич* — докт. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. отдела фотобиофизики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-5363; e-mail: yakov@belozersky.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0107-619X>

*Тайсова Александра Семеновна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела фотосинтеза и флуоресцентных методов исследований НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-5413; e-mail: taisova@belozersky.msu.ru

*Фетисова Зоя Григорьевна* — докт. физ.-мат. наук, гл. спец. отдела фотобиофизики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-5363; e-mail: zfetisova@belozersky.msu.ru

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.322.4

## Изучение конформационной подвижности липид-связывающего сайта изоформ $\epsilon 2$ , $\epsilon 3$ , $\epsilon 4$ аполипопротеина E методом молекулярной динамики

А.А. Мамчур<sup>1, 2, \*</sup> , В.В. Ерема<sup>1</sup> , Д.А. Каштанова<sup>1</sup> , М.В. Иванов<sup>1</sup>, В.С. Юдин<sup>1</sup> ,  
А.А. Кескинов<sup>1</sup> , С.А. Краевой<sup>1</sup> , С.М. Юдин<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью,  
Федеральное медико-биологическое агентство, Россия, 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1;

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

\*e-mail: amamchur@cspfmba.ru

Нейродегенеративные заболевания, в особенности болезнь Альцгеймера, являются одной из наиболее острых проблем человечества. Несмотря на растущее число исследований в данной области, молекулярные механизмы развития данных заболеваний до сих пор неизвестны. Полиморфизмы в гене *APOE*, кодирующем аполипопротеин E, достоверно ассоциированы как с развитием нейродегенеративных состояний (rs429358, C112R), так и с механизмами защиты от них (rs7412, R158C). В популяции человека присутствует три изоформы аполипопротеина E –  $\epsilon 2$  (белок с «защитной» заменой),  $\epsilon 3$  (белок дикого типа),  $\epsilon 4$  (белок с «патогенной» заменой). Данная работа посвящена изучению влияния описанных замен на функциональный участок белка – липид-связывающий сайт – методом молекулярной динамики. В исследовании одновременно рассмотрены все три изоформы аполипопротеина E. Показано, что как «патогенная», так и «защитная» аминокислотные замены приводят к изменению структуры липид-связывающего сайта по сравнению со структурой дикого типа, но суть этих изменений различна. Расстояние между N-концевой (аминокислоты 88-104) и C-концевой (аминокислоты 251-266)  $\alpha$ -спиралями липид-связывающего сайта увеличивается в обеих изоформах. Однако для изоформы  $\epsilon 2$  характерно сохранение структуры C-концевой  $\alpha$ -спирали, в то время как для изоформы  $\epsilon 4$  наблюдается расплетание участка из аминокислот 260-266. Для N-концевой  $\alpha$ -спирали наблюдается обратная ситуация. Можно предположить, что именно такие структурные различия в липид-связывающем сайте АпоЕ лежат в основе разного влияния описанных изоформ на клинические показатели носителей соответствующих генотипов. Кластерный анализ позволил выделить структуры, наиболее характерные для изоформ  $\epsilon 2$  и  $\epsilon 4$ , которые будут в дальнейшем использованы как стартовые конформации для последующих молекулярно-динамических исследований.

**Ключевые слова:** молекулярная динамика, аполипопротеин E, липид-связывающий сайт, транспорт липидов, нейродегенерация

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-3

Последние десятилетия отмечается общемировая тенденция к увеличению продолжительности жизни и демографическому старению населения. Именно пожилой возраст несет с собой бремя возраст-ассоциированных инвалидизирующих состояний, одним из которых является деменция. Причиной деменции часто является нейродегенерация и конкретно болезнь Альцгеймера (БА) [1], наиболее часто развивающаяся у людей старше 65 лет и находящаяся в первой десятке причин смерти по всему миру [2]. На данный момент БА является неизлечимым заболеванием, а имеющиеся лекарственные средства предлагают поддерживающую симптоматическую терапию [1, 2]. Несмотря на

возросшее число исследований в этой области, однозначного ответа на вопросы о молекулярном механизме патогенеза, и, соответственно, патогенетической терапии нет.

Широко известной генетической ассоциацией с болезнью Альцгеймера являются полиморфизмы rs429358 и rs7412 в гене *APOE*, который расположен на 19 хромосоме и кодирует аполипопротеин E (АпоЕ), участвующий в метаболизме липидов в организме человека [3]. АпоЕ связывается с триглицеридами и холестерином, в основном в виде липопротеинов низкой плотности, обеспечивая их взаимодействие с рецепторами целевых кле-

ток [3]. В периферических тканях АпоЕ в основном синтезируется клетками печени, в центральной нервной системе – астроцитами [3]. Нарушение транспорта и катаболизма липидов предположительно является одним из механизмов развития нейродегенеративных заболеваний, так как липиды необходимы для эффективного формирования миелиновой оболочки. Полиморфизм rs429358 (С112R) формирует вариант АпоЕ ε4, он ассоциирован с развитием БА и меньшей продолжительностью жизни [4]. Полиморфизм rs7412 (R158C) формирует вариант АпоЕ ε2, эффект этого полиморфизма прямо противоположен эффекту rs429358 [4]. Дикий тип белка АпоЕ формирует изоформу ε3.

По своей структуре АпоЕ представляет собой глобулярный белок с молекулярной массой 34 кДа и тремя основными доменами: N-концевым (аминокислоты 1-167), шарнирным (168-205) и С-концевым (206-299) [5]. В пространстве между N- и С-концевыми доменами происходит присоединение липидов [6]. Именно липид-связывающий сайт, включающий в себя аминокислоты 88-104 и 251-266 [6], стал основным объектом нашего исследования. Участок белка, состоящий из аминокислот 140-150, предположительно отвечает за связывание рецептора липопротеинов низкой плотности [6]. В связи с ассоциацией гена *APOE* с болезнью Альцгеймера были проведены исследования *in vitro* и *in silico* по изучению взаимодействий аполипопротеина E и бета-амилоида. По результатам этих исследований за связывание бета-амилоида могут отвечать аминокислоты 133-135 и 150-161 АпоЕ [7].

Изучение структуры полноразмерного АпоЕ экспериментальными методами затруднено образованием агрегатов из-за значительной доли гидрофобных аминокислот в С-концевом домене [5]. Внесение определенных мутаций (F257A, W264R, V269A, L279Q, V287E) позволяет избежать агрегации при сохранении биологических функций [8]. Именно при помощи такого метода была получена единственная на данный момент полноразмерная экспериментальная структура АпоЕ – 2L7B в Protein Data Bank [5]. До ее появления представления о структуре АпоЕ базировались на результатах спектроскопии кругового дихроизма [9]. Предполагалось, что нарушение функций АпоЕ в изоформе ε4 связано с формированием солевого мостика R61-E255, который затрудняет связывание липидов [9], однако позже эта гипотеза была опровергнута [5].

Отсутствие однозначной полноразмерной структуры затрудняет анализ молекулярных механизмов, лежащих в основе изменений функций АпоЕ, вызванных заменами С112R и R158C, актуализируя использование теоретических методов молекулярного моделирования, представленных в данной работе.

## Материалы и методы

**Выбор стартовых конформаций.** В качестве стартовой конформации для АпоЕ дикого типа была выбрана структура 2L7B из базы данных Protein Data Bank [5]. Стартовые конформации для изоформ ε2 и ε4 были получены путем внесения замен R158C и C112R соответственно с помощью функции «Мутагенез» программного пакета PyMOL (Schrödinger). Модели, соответствующие изоформам ε2, ε3 и ε4, названы АРОЕ2, АРОЕ3 и АРОЕ4 соответственно.

**Молекулярная динамика (МД).** Молекулярную динамику (МД) проводили с использованием пакета GROMACS [10] версии 2022.2 и полноатомного силового поля CHARMM27 [11]. Временной шаг интегрирования составил 2 фс. Белок помещался в кубическую ячейку размером 8 нм × 8 нм × 8 нм, применены периодические граничные условия. Температура 300 К и давление 1 атм поддерживались в системе с помощью алгоритмов V-rescale [12] и Parrinello-Rahman [13] соответственно. Растворитель учтен в явном виде (модель воды TIP4P [14]). Для электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий был установлен радиус отсечки 12 Å. Энергию электростатических взаимодействий рассчитывали с использованием алгоритма PME [15]. Для нейтрализации системы добавлялись ионы Na<sup>+</sup>. Перед МД-моделированием проводилась минимизация энергии (методом сопряженных градиентов, 10000 итераций) с последующим нагревом от 5 до 300 К в течение 5 нс. Для каждой модели были рассчитаны траектории длительностью 500 нс, что суммарно составляет 1,5 мкс динамики аполипопротеина E.

**Анализ данных.** Подвижность полноразмерного белка была проанализирована с помощью показателей RMSD (root-mean-square deviation, среднеквадратичное отклонение атомов) и RMSF (root-mean-square-fluctuation, среднеквадратичные колебания альфа-углеродов аминокислот – атомов, которые непосредственно присоединены к карбоксильной и аминогруппам), рассчитанных библиотекой MDAnalysis (Python 3.9.12) [16].

Для прицельного анализа липид-связывающего сайта АпоЕ были выбраны участки белка, состоящие из аминокислот 88-104 и 251-266, описанные в статье Фридена и соавторов [6]. По тексту работы эти участки обозначены как N-концевая и С-концевая α-спираль липид-связывающего сайта соответственно. Для липид-связывающего сайта было дополнительно рассчитано значение RMSD. Анализ вторичных структур осуществлен с использованием функции do\_dssp программного пакета GROMACS. Для анализа аминокислотных контактов использовалась библиотека MDAnalysis. Наличие контакта было определено как расположение атомов в составе двух аминокислот на расстоянии меньшем или

равном 4 Å. Программа ENCORE была использована для анализа сходства кластерных ансамблей [17]. Кластерный анализ траекторий проводился с помощью метода DBSCAN. В качестве метрики для оценки сходства кластерных ансамблей выбрана дивергенция Йенсона-Шеннона. Данные визуализированы с помощью библиотек Matplotlib и seaborn языка программирования Python (версия 3.9.12) и программного пакета PyMOL (Schrödinger).

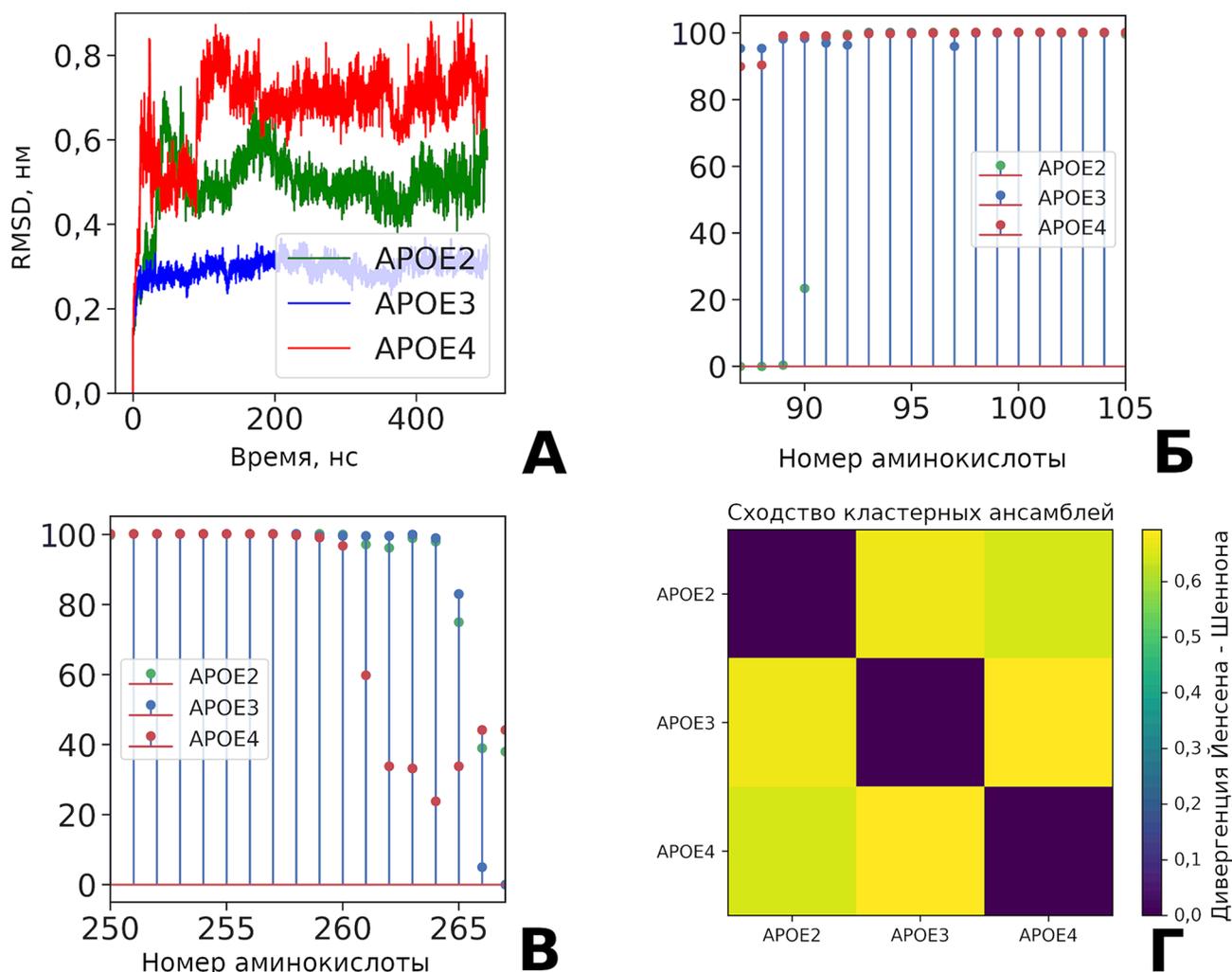
### Результаты и обсуждение

Мы рассмотрели поведение всех вариантов белка АпоЕ в растворе методом МД с оценкой среднеквадратичного отклонения атомов RMSD. Интересно отметить, что наиболее стабильным на протяжении всей симуляции оставался вариант АРОЕ3 (максимальное значение RMSD от стартовой конформации 0,7 нм), в то время как АРОЕ4 сильнее всего отклоняется от первоначальной структуры в результате динамики (максимум RMSD 1,02 нс) (рис. 1А, Приложение). Дополнительно была проанализирована подвижность не только полноразмерных белков, но и их отдельных доменов (рис. 1Б и 1В, Приложение), а также среднеквадратичные колебания RMSF альфа-углеродов отдельных аминокислот (рис. 2, Приложение). На основании этих данных мы заключили, что для всех вариантов АпоЕ наибольший вклад в отклонение от первоначальной структуры вносит С-концевой домен (RMSD 0,8–1,1 нм) (рис. 1В, Приложение), тогда как для N-концевого домена RMSD не превышает 0,7 нм (рис. 1Б, Приложение). При этом динамика RMSD для N-концевого домена АРОЕ2 практически совпадает с аналогичной динамикой для АРОЕ3, а N-концевой домен АРОЕ4 отклоняется на 0,15 нм дальше. В то же время при анализе флуктуаций альфа-углеродов аминокислот (рис. 2, Приложение) мы можем заметить, что отличия в подвижности N-концевых доменов незначительны. Тот же анализ RMSF показывает значительное повышение подвижности в шарнирном домене АРОЕ4. Также АРОЕ4 показывает большую подвижность в С-концевом домене, чем дикий тип АРОЕ3. Несмотря на сходство в динамике RMSD С-концевых доменов АРОЕ2 и АРОЕ4, пик подвижности АРОЕ4 приходится на аминокислоты 260–280, тогда как АРОЕ2 наиболее подвижен в областях 230–250 и 290–299. Таким образом, варианты АРОЕ4 и АРОЕ2 являются менее стабильными относительно дикого типа, однако максимальные колебания в этих вариантах локализованы в разных участках аминокислотной последовательности.

Наличие определенных аллелей гена *APOE* ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  или  $\epsilon 4$ ) является одним из факторов, определяющих метаболизм липидов у человека. В связи с этим особое внимание в нашем исследовании

белка АпоЕ было уделено структуре липид-связывающего сайта, описанной группой Фридена и соавторов [6]. В его состав входят две  $\alpha$ -спирали, расположенные параллельно в белке дикого типа – N-концевая  $\alpha$ -спираль (аминокислоты 88–104) и С-концевая  $\alpha$ -спираль (аминокислоты 251–266) [6]. Стабильность липид-связывающих сайтов различных изоформ АпоЕ относительно стартовой конформации также оценивалась с помощью параметра RMSD (рис. 1А). По данным анализа наиболее стабильная структура и, соответственно, наименьшее отклонение от стартовой конформации характерны для модели АРОЕ3 (рис. 1А). RMSD для нее не превышает 0,3 нм. Наибольшее отклонение от первоначальной структуры наблюдается для липид-связывающего сайта модели АРОЕ4 (рис. 1А). Для нее RMSD достигает 0,8 нм, что почти в 3 раза выше, чем для белка дикого типа. Отклонение для модели АРОЕ2 также довольно высоко и составляет в среднем 0,5 нм. При этом для всех моделей наблюдается выход RMSD на плато. Можно предположить, что каждая модель достигает своего оптимального состояния, при этом для АРОЕ4 этот оптимум наиболее удален от стартовой конформации, а значит и от АРОЕ3 (в связи с методикой получения стартовых конформаций). Дальнейшие исследования были направлены на изучение структурных особенностей описанных оптимумов.

Для описания взаимодействия N- и С- концевых  $\alpha$ -спиралей липид-связывающего сайта АпоЕ был проведен анализ контактов между их аминокислотами. Наиболее стабильные контакты перечислены в таблице. Карты контактов представлены в приложении (рис. 3. Приложение). Для белка дикого типа характерны 12 стабильных контактов (присутствуют в более чем 70% фреймах траектории) (таблица). Некоторые из них (R92-S263, K95-E255, E96-S263) ранее были описаны исследователями, впервые получившими ЯМР-структуру АпоЕ [5] (рис. 2А). Контакты E88-K262 и T89-E266, также представленные в их статье [5], в нашей траектории присутствовали, но оказались нестабильными (длительность менее 8% времени симуляции) (рис. 2Б). Другие же контакты (T89-K262, Q98-R251), ожидаемые в области липид-связывающего сайта, после этапа минимизации энергии пропадали вовсе (рис. 2Г). Таким образом, проведенный анализ контактов, присутствующих на протяжении 500 нс МД, обновляет наши представления о состоянии белка дикого типа, так как многие из ожидаемых контактов не сохраняются в динамике. В траектории, полученной для модели АРОЕ2, был обнаружен относительно стабильный солевой мостик E96-R264 (рис. 2Г), который почти не присутствовал в траектории АРОЕ3 (рис. 2Д). В то же время в АРОЕ2 нарушены контакты, характерные для белка дикого типа. В траектории АРОЕ4 любые стабильные



**Рис. 1.** Результаты анализа конформационной подвижности вариантов ApoE. **А** – зависимость RMSD от времени для липид-связывающих сайтов моделей ApoE2, ApoE3, ApoE4. **Б, В** – анализ вторичных структур в составе липид-связывающих сайтов моделей ApoE2, ApoE3, ApoE4. По оси абсцисс расположены номера аминокислот, по оси абсцисс указана доля (в %) времени молекулярно-динамической симуляции, в течение которого данная аминокислота вовлечена в образование  $\alpha$ -спирали; **Г** – дивергенция Йенсена-Шеннона, отражающая сходство кластерных ансамблей изоформ ApoE2, ApoE3, ApoE4.

Таблица

Анализ контактов аминокислот С- и N-концевой спиралью липид-связывающего сайта

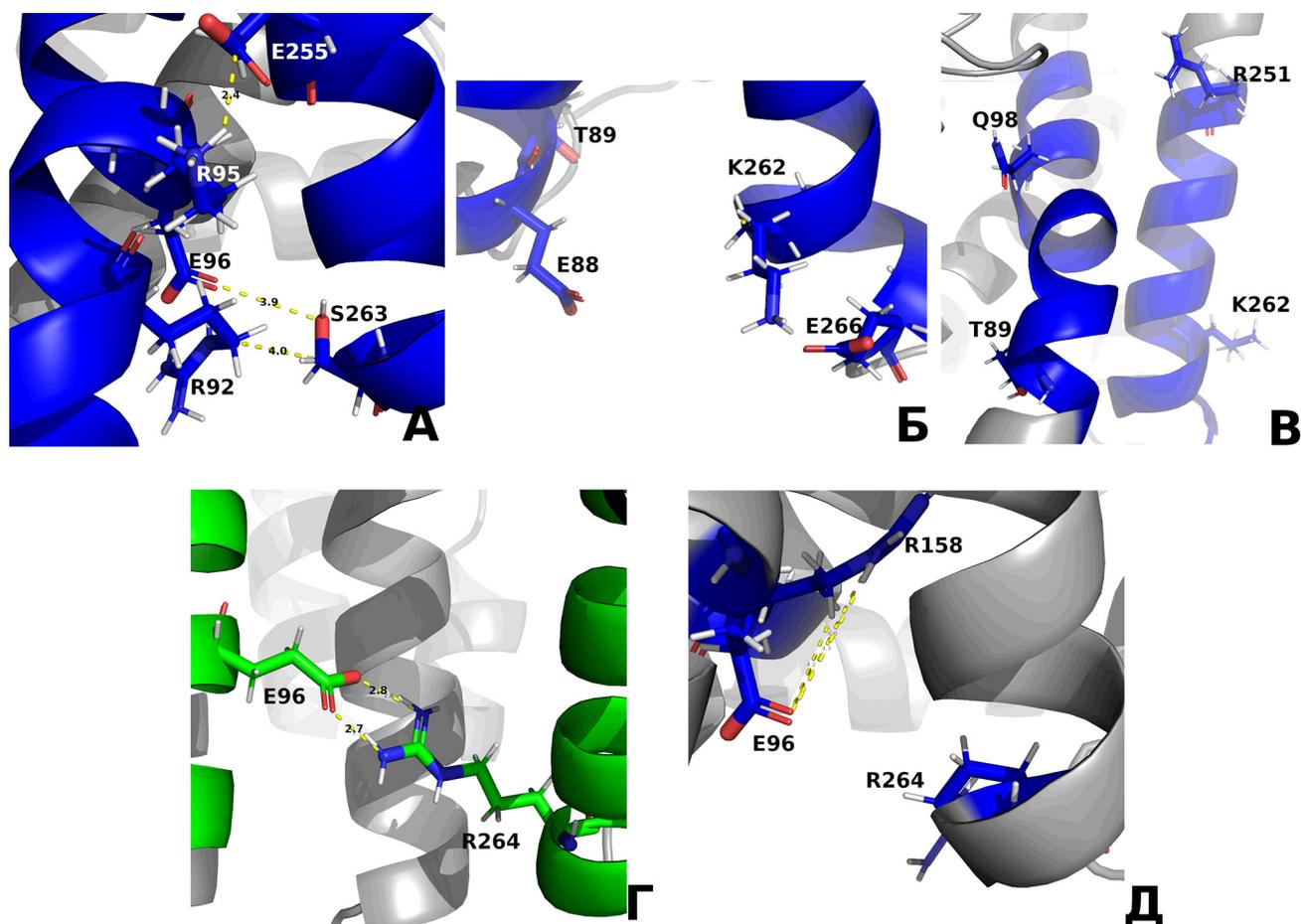
Аминокислота N-концевой спирали	Аминокислота С-концевой спирали	Длительность контакта (в % от времени симуляции) в модели		
		APOE2	APOE3	APOE4
R92	A259	2,6%	78,1%	0,2%
R92	K262	2,6%	71,5%	0,4%
R92	S263	7,1%	73,5%	0,7%
K95	E255	4%	96,5%	2,5%
K95	A256	0,5%	99,8%	0%
K95	A259	2,1%	96,4%	0,4%
E96	A256	1,6%	93,9%	0,02%
E96	A259	2,1%	73,1%	0,7%
E96	R260	39,1%	75,5%	3,7%
E96	S263	6,9%	97,1%	1,2%
E96	R264	64,2%	31%	0,6%
R103	L252	3,2%	78,5%	1,3%
R103	Q253	17,9%	98,1%	1,5%

контакты отсутствовали. Среди 40 найденных контактов ни один не длился дольше 4% времени молекулярно-динамической симуляции. Описанное нарушение контактов говорит о том, что для моделей АРОЕ2 и АРОЕ4 характерно большее расстояние между С- и N-концевыми  $\alpha$ -спиралями, входящими в состав липид-связывающего сайта, чем для модели АРОЕ3.

Для уточнения характера структурных изменений, происходящих при расширении щели между С- и N-концевыми  $\alpha$ -спиралями, входящими в состав липид-связывающего сайта, была проанализирована стабильность вторичной структуры белка. По данным, представленным на рис. 1Б, в моделях АРОЕ3 и АРОЕ4 N-концевая  $\alpha$ -спираль (аминокислоты 88-104) остается стабильной на протяжении всей траектории. В модели АРОЕ2 наблюдается расплетение N-концевой  $\alpha$ -спирали на участке из аминокислот 88-90 (рис. 1Б). Для изоформы  $\epsilon 4$ , напротив, характерно нарушение целостности С-концевой  $\alpha$ -спирали на участке 261-265, которое отсутствует в моделях АРОЕ2 и АРОЕ3 (рис. 1В).

Понять, как именно проявляются описанные выше закономерности в трехмерной структуре, помогло сравнение кластерных ансамблей, образуемых моделями в ходе молекулярно-динамической симуляции. Дивергенция Йенсена-Шеннона, близкая к нулю, описывает абсолютную идентичность кластерных ансамблей структур. Соответственно, рис. 1Г демонстрирует, что сходство между ансамблями моделей АРОЕ3 и АРОЕ4 практически отсутствует. При этом присутствуют похожие паттерны в кластеризации моделей АРОЕ2 и АРОЕ3, а также АРОЕ2 и АРОЕ4. Для более глубокого понимания структурных особенностей моделей АРОЕ2, АРОЕ3, АРОЕ4 был проанализирован состав полученных кластерных ансамблей.

Суммарно вся система из трех траекторий содержит в себе 10 кластеров, образованных структурами, принадлежащими как одной, так и нескольким моделям. Кластерный анализ подтверждает стабильность липид-связывающего сайта изоформы  $\epsilon 3$  – вся траектория модели АРОЕ3 вошла в кластер 0. Этот же кластер содер-



**Рис. 2.** Некоторые из анализируемых контактов. А – стабильные контакты в структуре липид-связывающего сайта изоформы АРОЕ3, ранее описанные авторами структуры 2L7В. Б – нестабильные контакты в структуре липид-связывающего сайта изоформы АРОЕ3, ранее описанные авторами структуры 2L7В. В – полностью отсутствующие контакты в структуре липид-связывающего сайта изоформы АРОЕ3, ранее описанные авторами структуры 2L7В. Г – присутствие солевого мостика E96-R264 в структуре липид-связывающего сайта изоформы АРОЕ2. Д – отсутствие солевого мостика E96-R264 в структуре липид-связывающего сайта изоформы АРОЕ3.

жит в себе начальные фреймы траекторий АРОЕ2 (0,9% от общего числа фреймов) и АРОЕ4 (0,2%), что ожидаемо с учетом методики формирования стартовых конформаций. Остальные фреймы траектории АРОЕ2 были распределены между кластерами 1, 2, 3, 4, 5 и 6 (2,2%, 7,4%, 2,2%, 4,8%, 81,2% и 1,4% соответственно), АРОЕ4 – между кластерами 2, 7, 8 и 9 (5,6%, 1,6%, 11,8% и 80,8% соответственно). Центроиды самых заселенных кластеров (№№ 0, 5, 9), соответствующие наиболее характерным для каждой из трех моделей структурам, представлены на рис. 3.

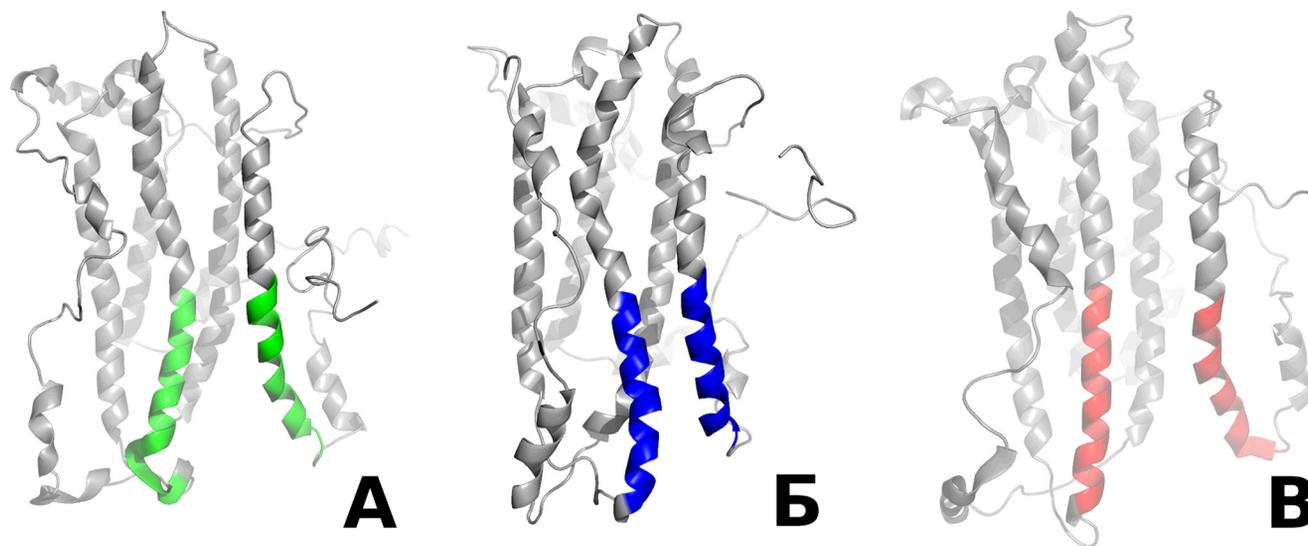
В течение траектории молекулярной динамики изоформы  $\epsilon 2$  происходит поворот  $\alpha$ -спиралей, входящих в состав липид-связывающего домена, в параллельных плоскостях, а затем эти плоскости удаляются друг от друга. Вероятно, этот поворот происходит вокруг солевого мостика E96-R264, описанного выше (таблица, рис. 2Д). При этом структура С-концевой  $\alpha$ -спирали сохраняется (рис. 1В, 3А), тогда как участок N-концевой  $\alpha$ -спирали теряет вторичную структуру (рис. 1Б, 3А). Сопоставляя информацию о структуре центроидов и стабильности вторичных структур, можно предположить, что в моделях АРОЕ3 и АРОЕ4 N-концевая  $\alpha$ -спираль стабилизирована солевым мостиком E96-R158 (рис. 2Г). Однако при внесении замены R158C данный контакт разрушается, и E96 притягивается к R264 (рис. 2Д), тем самым дестабилизируя  $\alpha$ -спираль.

Для изоформы  $\epsilon 4$  также характерно удаление N-концевой и С-концевой  $\alpha$ -спиралей друг от друга, однако оно происходит по другому механизму. В данном случае С-концевая  $\alpha$ -спираль как бы «оттягивается», увеличивая размер щели и постепенно расплетая участок, состоящий из аминокислот 260-266 (рис. 1В и 3В). Такая

ситуация объяснима стабильностью N-концевой  $\alpha$ -спирали при одновременно более мобильной С-концевой, что согласуется с ранее полученными экспериментальными данными о высокой подвижности изоформы  $\epsilon 4$  [6].

О нарушении прочности взаимодействий между N- и С-концевой  $\alpha$ -спиралями липид-связывающего сайта изоформ  $\epsilon 2$  и  $\epsilon 4$  свидетельствуют также энергетические характеристики (рис. 6 и 7, Приложение). Средняя энергия электростатических взаимодействий для  $\epsilon 2$  и  $\epsilon 4$  составляет -74,17 кДж/моль и -10,66 кДж/моль соответственно, тогда как для  $\epsilon 3$  – -259,16 кДж/моль. Аналогичная ситуация наблюдается для Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий: -15,11 кДж/моль для  $\epsilon 2$ , -83,23 кДж/моль для  $\epsilon 3$  и -1,69 кДж/моль для  $\epsilon 4$ . Уменьшение модуля энергии в изоформах  $\epsilon 2$  и  $\epsilon 4$  вероятнее всего является следствием увеличения расстояния между описываемыми спиральями.

Необходимо отметить, что структура 217b из базы данных Protein Data Bank, используемая в данном исследовании как основа для построения стартовых конформаций, была получена с использованием мутантного белка АпоЕ (A257R264A269Q279E287). Вводимые замены (F257A, W264R, V269A, L279Q, V287E) делают С-концевой домен менее гидрофобным. Некоторые из них (F257A, W264R) находятся в исследуемой области белка и могут вносить существенный вклад в конформационную подвижность липид-связывающего сайта. Более того, именно аминокислота R264 образует солевой мостик с E96 N-концевой  $\alpha$ -спирали липид-связывающего сайта АРОЕ2, который сильно влияет на динамику этой изоформы. При удалении этой аминокислоты и возвращении триптофана в положение 264 обнаруженный контакт может быть нарушен. Не-



**Рис. 3.** Структуры липид-связывающих сайтов АРОЕ2 (А), АРОЕ3 (Б), АРОЕ4 (В), представляющие центроиды наиболее заселенных кластеров в каждой модели.

смотря на имеющиеся данные о сохранении биологической активности изоформы АРОЕ3 при введении указанных замен [8], экспериментов по их влиянию на изоформы АРОЕ2 и АРОЕ4 не проводилось. Данный факт накладывает ограничения на проведенное исследование, из-за чего мы вынуждены утверждать, что описанные выше результаты справедливы только для мутантной (A257R264A269Q279E287) формы белка.

Таким образом, изоформы  $\epsilon 2$  и  $\epsilon 4$  аполипопротеина Е содержат в себе измененный, по сравнению с  $\epsilon 3$ , липид-связывающий сайт, однако механизм этих изменений различен. Несмотря на то, что замены, определяющие изоформу белка, расположены вне липид-связывающего сайта, их внесение влияет на его структуру и динамику через сеть аминокислотных контактов. Для изоформы  $\epsilon 2$  характерно сохранение структуры С-концевой  $\alpha$ -спирали, в то время как для изоформы  $\epsilon 4$  наблюдается расплетание участка из аминокислот 260–266. Расстояние между N-концевой (аминокисло-

ты 88–104) и С-концевой (аминокислоты 251–266)  $\alpha$ -спиралями липид-связывающего сайта увеличивается в обеих изоформах. Для N-концевой  $\alpha$ -спирали наблюдается обратная ситуация. Можно предположить, что именно такие структурные различия в липид-связывающем сайте АпоЕ лежат в основе разного влияния описанных изоформ на клинические показатели людей-носителей. Проведенный кластерный анализ позволил выделить структуры, наиболее характерные для изоформ  $\epsilon 2$  и  $\epsilon 4$ , которые будут в дальнейшем использованы как стартовые конформации для последующих молекулярно-динамических исследований, в том числе моделирования непосредственно комплексов АпоЕ и липидов.

Работа выполнена без привлечения финансирования. Исследование проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377(9770):1019–1031.
- 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2021;17(2):327–406.
- Huang Y, Mahley R.W. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol. Dis.* 2014;72(Pt. A):3–12.
- Deelen J., Evans D.S., Arking D.E., Tesi N., Nygaard M., Liu X., et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies multiple longevity genes. *Nat. Commun.* 2019;10:3669.
- Chen J., Li Q., Wang J. Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(36):14813–14818.
- Frieden C., Wang H., Ho C.M.W. A mechanism for lipid binding to apoE and the role of intrinsically disordered regions coupled to domain–domain interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017;114(24):6292–6297.
- Tsiolaki P.L., Katsafana A.D., Baltoumas F.A., Louros N.N., Iconomidou V.A. Hidden aggregation hotspots on human apolipoprotein E: A structural study. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(9):2274.
- Zhang Y., Vasudevan S., Sojitrawala R., Zhao W., Cui C., Xu C., Fan D., Newhouse Y., Balestra R., Jerome W.G., Weisgraber K., Li Q., Wang J. A monomeric, biologically active, full-length human apolipoprotein E. *Biochemistry*. 2007;46(37):10722–10732.
- Hatters D.M., Peters-Libeu C.A., Weisgraber K.H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* 2006;31(8):445–454.
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Pall S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19–25.
- Klada J.B., Venable R.M., Freites J.A., O'Connor J.W., Tobias D.J., Mondragon-Ramirez C., Vorobyov I., MacKerell A.D., Pastor R.W. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B*. 2010;114(23):7830–7843.
- Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007;126(1):014101.
- Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 1981;52(12):7182–7190.
- Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 1983;79(2):926–935.
- Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 1995;103(19):8577–8593.
- Michaud-Agrawal N., Denning E.J., Woolf T.B., Beckstein O. MDAAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* 2011;32(10):2319–2327.
- Tiberti M., Papaleo E., Bengtson T., Boomsma W., Lindorff-Larsen K. ENCORE: Software for quantitative ensemble comparison. *PLoS Comput. Biol.* 2015;11(10):e1004415.

Поступила в редакцию 07.03.2023

После доработки 19.04.2023

Принята в печать 28.04.2023

RESEARCH ARTICLE

# Molecular dynamics simulation of the conformational mobility of the lipid-binding site in the Apolipoprotein E isoforms $\epsilon 2$ , $\epsilon 3$ , and $\epsilon 4$

A.A. Mamchur<sup>1, 2, \*</sup> , V.V. Erema<sup>1</sup> , D.A. Kashtanova<sup>1</sup> , M.V. Ivanov<sup>1</sup>, V.S. Yudin<sup>1</sup> ,  
A.A. Keskinov<sup>1</sup> , S.A. Kraevoy<sup>1</sup> , S.M. Yudin<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency (Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia), 10-1 Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russia;

<sup>2</sup>Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

\*e-mail: amamchur@cspfmba.ru

Neurodegenerative disorders, particularly Alzheimer’s disease, have become a major healthcare issue all over the world. Despite extensive research, the molecular mechanisms underlying these conditions are yet to be identified. APOE is the apolipoprotein E-coding gene. Its polymorphisms have been found to be significantly associated with both neurodegenerative disorders (rs429358, C112R) and protective effects against these disorders (rs7412, R158C). Humans carry three apolipoprotein E isoforms:  $\epsilon 2$  (protein with a protective mutation),  $\epsilon 3$  (wild-type protein), and  $\epsilon 4$  (protein with a pathogenic mutation). The study sought to investigate how these substitutions affect the lipid-binding site, which is the functional region of the protein. Molecular dynamics simulation was used to analyze all three isoforms. We found that, unlike the wild-type isoform, both the pathogenic and protective mutations caused changes in the lipid-binding site. The changes, however, were different. Both  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 4$  lead to an increased distance between the N-terminal (amino acids 88-104) and the C-terminal (amino acids 251-266) helices. However, in  $\epsilon 2$ , the C-terminal helix retained its structure, whereas in  $\epsilon 4$ , it unwound between amino acids 260 and 266. The opposite was true for the N-terminal helix. It is safe to assume that it is these structural differences in the lipid-binding site that account for the different effects of these two isoforms and clinical characteristics of their carriers. The clustering analysis allowed for the identification of the structures, most typical of  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 4$ , which could be used as the foundation for further molecular dynamics studies.

**Keywords:** *molecular dynamics, Apolipoprotein E, lipid-binding site, lipid transport, neurodegeneration*

**Funding:** The study was performed without financial support.

## Сведения об авторах

*Мамчур Александра Александровна* – аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «ЦСП» ФМБА России; аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-540-61-75 (доб. 4141); e-mail: amamchur@cspfmba.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6025-7663>

*Ерема Вероника Вячеславовна* – канд. мед. наук, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Тел.: 8-495-540-61-75; e-mail: verema@cspfmba.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0547-3280>

*Каштанова Дарья Андреевна* – канд. мед. наук, вед. аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Тел.: 8-495-540-61-75; e-mail: dkashtanova@cspfmba.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8977-4384>

*Иванов Михаил Вячеславович* – аналитик 2-й категории отдела медицинской геномики ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Тел.: 8-495-540-61-75; e-mail: mivanov@cspfmba.ru

*Юдин Владимир Сергеевич* – канд. биол. наук, начальник отдела медицинской геномики ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Тел.: 8-495-540-61-75; e-mail: vyudin@cspfmba.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9199-6258>

*Кескинов Антон Артурович* – канд. мед. наук, канд. эконом. наук, начальник управления организации проведения научных исследований ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Тел.: 8-495-540-61-75; e-mail: keskinov@cspfmba.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7378-983X>

*Краевой Сергей Александрович* – первый заместитель генерального директора ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Тел.: 8-495-540-61-75; e-mail: skraevoy@cspfmba.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1775-9235>

*Юдин Сергей Михайлович* – докт. мед. наук, проф., ген. директор ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Тел.: 8-495-540-61-75; e-mail: yudin@cspfmba.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.29

**Влияние карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP) на FcεRI-зависимую продукцию цитокинов клетками RBL-2H3****А.Н. Павлюченкова<sup>1,2</sup> , М.С. Смирнов<sup>1,2</sup> , М.А. Челомбитко<sup>1,\*</sup> **<sup>1</sup>*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;*<sup>2</sup>*Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73**\*e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru*

Ключевое значение в развитии аллергических заболеваний имеют тучные клетки (ТК). Основную роль в активации ТК при аллергии играет взаимодействие антигенов с иммуноглобулином E и последующее связывание этих комплексов с рецептором FcεRI, что в конечном счете приводит к быстрому экзоцитозу гранул и последующей продукции цитокинов. Имеются данные о роли мембранного потенциала митохондрий в FcεRI-зависимой активации ТК. Так, применение классических разобщителей окислительного фосфорилирования снижает уровень дегрануляции ТК. Однако их влияние на продукцию цитокинов ТК не изучено. В настоящей работе было продемонстрировано, что предварительная обработка ТК линии RBL-2H3 разобщителем карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразоном (FCCP) приводит к уменьшению не только уровня FcεRI-зависимой дегрануляции, но и продукции цитокинов TNFα и IL-4. При этом FCCP препятствует фосфорилированию адаптерной молекулы LAT, а также киназы Erk1/2, что может лежать в основе ингибирующего влияния разобщителя на FcεRI-зависимую активацию клеток линии RBL-2H3. Полученные данные свидетельствуют о том, что мембранный потенциал митохондрий играет важную роль в FcεRI-зависимой активации ТК, а разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания митохондрий с помощью разобщителей может использоваться для регуляции этого процесса.

**Ключевые слова:** *тучные клетки, разобщители, митохондрии, аллергия, FcεRI-зависимая активация, FCCP*

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-4

Ключевое значение в развитии аллергических заболеваний играют тучные клетки (ТК). Они выполняют свои функции за счет секреции широкого спектра биологически активных соединений. Медиаторы ТК можно разделить на две категории: предварительно сформированные медиаторы, которые запасаются в секреторных гранулах, и вновь синтезированные медиаторы, образуемые только после стимуляции клеток. Секреторные гранулы ТК содержат лизосомальные белки (такие как β-гексозаминидаза), биогенные амины (такие как гистамин и серотонин), гликозаминогликаны (такие как сульфаты гепарина и хондроитина) и ферменты (такие как триптаза и химаза). Ко второй группе медиаторов относятся метаболиты арахидоновой кислоты, цитокины, хемокины и факторы роста [1–4].

Основную роль в активации ТК при аллергии играет взаимодействие антигенов с иммуноглобулином E (IgE) и последующее связывание этих комплексов с его высокоафинным рецептором FcεRI, что в конечном счете приводит к быстрому

экзоцитозу гранул и последующей продукции вновь синтезированных медиаторов [5].

В литературе имеются данные о роли мембранного потенциала митохондрий (ΔΨm) в FcεRI-зависимой активации ТК. Так, разобщитель карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон ингибирует антиген-индуцированную секрецию β-гексозаминидазы в линии ТК крыс RBL-2H3 [6]. Разобщитель карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) также подавлял уровень IgE-опосредованной дегрануляции ТК костного мозга мышей и клеток RBL-2H3 [7].

Многие природные и синтетические соединения обладают разобщающей активностью. Одним из таких соединений является антибактериальный и противогрибковый агент триклозан. Триклозан вызывает снижение ΔΨm и продукции АТФ, а также способствует фрагментации митохондрий и образованию активных форм кислорода (АФК) в нестимулированных клетках RBL-2H3. При стимуляции ТК триклозан ингибирует полимериза-

цию микротрубочек и транслокацию митохондрий к плазматической мембране, а также подавляет поступление внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану. В то же время триклозан увеличивает экспрессию цитокина TNF $\alpha$  [8, 9]. Влияние классических разобщителей на продукцию вновь синтезированных медиаторов исследовано не было. Среди классических разобщителей FCCP является одним из наиболее широко используемых агентов и помимо непосредственного разобщения окислительного фосфорилирования может оказывать влияние на такие клеточные процессы, как аутофагия, синтез АФК, перемещение митохондрий, поддержание гомеостаза кальция, регуляция рН лизосом [10]. В частности, существует ряд работ в рамках исследования возможных механизмов действия FCCP на активацию ТК [7, 11, 12]. В связи с этим нами было изучено воздействие разобщителя FCCP на продукцию вновь синтезированных цитокинов в клетках базофильной лейкемии крыс RBL-2H3.

### Материалы и методы

**Клетки и схема их обработки.** Исследования проводили на клеточной линии базофильной лейкемии крысы (RBL-2H3). Для культивирования клеток использовали смесь сред  $\alpha$ -MEM (ПанЭко, Россия) и RPMI (ПанЭко, Россия) в соотношении 7:2, с добавлением 0,3 г/л L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ . Клетки пассировали с использованием смеси растворов Версена и трипсина (ПанЭко, Россия). Эксперименты проводили на 6- и 12-луночных планшетах для адгезионных культур (Eppendorf, США).

**Тест на цитотоксичность.** Влияние FCCP (Sigma, США) на жизнеспособность клеток линии RBL-2H3 оценивали с использованием резазуринового теста. Клетки высевали в 96-луночный планшет (10 тыс. клеток на лунку) и обрабатывали FCCP в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 2 ч при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ . Далее клетки отмывали в среде и через 24 ч анализировали их жизнеспособность. Для этого к клеткам добавляли 25 мкл стокового раствора резазурина в концентрации 1,25 мМ (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 3 ч при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ . Уровень флуоресценции резорурфина, образующегося в результате восстановления резазурина в образцах, регистрировали при длинах волн поглощения и эмиссии 560 нм и 590 нм соответственно с использованием планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, США).

**Сенсибилизация и антигенная стимуляция клеток.** Сенсибилизацию клеток проводили путем инкубации в течение ночи с мышинными моноклональными антителами изотипа IgE к динитрофенилу (Sigma, #D8406, США) в концентрации 0,2 мкг/мл. Для последующей антигенной

стимуляции сенсибилизированные клетки отмывали в буфере Хэнкса (ПанЭко, Россия) (эксперименты по оценке уровня дегрануляции) или в среде (эксперименты по оценке уровня продукции цитокинов и исследования сигналинга), затем на различное время (указано в подписях к рисункам) добавляли 1 мкг/мл динитрофенола, конъюгированного с бычьим сывороточным альбумином (ДНФ-БСА) (Molecular probes, #A23018, США). Перед антигенной стимуляцией к клеткам добавляли FCCP в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкМ и инкубировали 37°C и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 1 ч.

**Оценка уровня дегрануляции клеток.** Уровень спонтанной (в отсутствие стимуляции) и Fc $\epsilon$ RI-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3 оценивали путем выявления активности  $\beta$ -гексозаминидазы в кондиционированной среде и лизате клеток, которую измеряли по высвобождению p-нитрофенола из субстрата (4-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминид, Sigma, США) по стандартной методике [13]. Флуоресценцию образцов регистрировали при помощи планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 460 нм (длина волны поглощения 355 нм) и программного обеспечения Ascent Software ver. 2.6. Уровень высвобождения  $\beta$ -гексозаминидазы (%) в образце определяли по формуле  $A/(A+B) \times 100\%$ , где A – интенсивность флуоресценции в кондиционированной среде, B – интенсивность флуоресценции клеточного лизата.

**Выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени.** Выделение РНК проводили по протоколу с реагентами Quick-RNA<sup>TM</sup> MiniPrep (Zymo Research, США). Измерение концентрации РНК проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и программного обеспечения ND-1000 ver. 3.8.1. кДНК получали с использованием набора RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси, состоящей из флуоресцентного интеркалирующего красителя EvaGreen, референсного красителя ROX, ДНК-полимеразы SynTaq, набора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, глицерина, Tween 20, KCl, TrisHCl (pH 8,8) и MgCl<sub>2</sub> (Синтол, Россия). Амплификацию осуществляли с использованием CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) и программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager ver. 3.1 в следующих условиях: 95°C 3' → (95°C 15'' → 56°C 15'' → 72°C 15'') × 40. Для расчета изменений относительной экспрессии генов применяли метод  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . В качестве референсного гена для нормирования данных об экспрессии мРНК целевых генов использовали

ген *18S* рибосомальной РНК. Последовательности праймеров указаны в табл. 1.

**Вестерн-блот.** Для разделения образцов методом электрофореза в SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel) при денатурирующих условия использовали 5%-й концентрирующий и 12%-й разделяющий гели. Идентификацию молекулярных масс белков проводили с использованием коммерческой смеси лизатов окрашенных белков PageRuler™ (Thermo Fisher Scientific, США). После этого осуществляли электроблоттинг образцов с геля на мембрану LF PVDF (Bio-Rad, США) в течение 120 мин при постоянной силе тока 200 мА. Для блокирования неспецифического связывания вторичных антител мембраны инкубировали в течение 20 мин в блокирующем буфере, содержащем 5%-е обезжиренное молоко, 0,1% детергента Tween 20 (AppliChem, Германия) в физиологическом растворе с трис-буфером, а далее на мембраны последовательно наносили раствор первичных и вторичных антител (табл. 2) с соответствующими промывками. Инкубацию с первичными антителами осуществляли в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами – в течение 1 ч при комнатной температуре. Для проявления сигнала использовали набор SuperSignal West Dura (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Реакцию визуализировали при помощи прибора ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США), дальнейшую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad, США).

**Определение концентрации цитокинов *IL-4* и *TNFα*.** Определение уровня цитокинов *IL-4* и *TNFα* в среде культивирования осуществлялось с помощью коммерческих наборов для иммуно-

ферментного анализа (MyBioSource, США) согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 путем сравнения групп с помощью двухстороннего дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественных сравнений Тьюки.

## Результаты

Клеточная линия базофильной лейкемии крыс RBL-2H3 использовалась в данном исследовании в качестве модели ТК. Эти клетки используются в качестве общепринятой модели в исследованиях FcεRI-зависимой активации базофилов и ТК [14]. Для оценки цитотоксичности FCCP был применен резазуриновый тест. FCCP ни в одной из исследуемых нами концентраций не снижал жизнеспособность клеток (рис. 1А). Также мы подтвердили полученные другими авторами данные об ингибирующем влиянии FCCP на уровень FcεRI-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3. Так, предобработка клеток FCCP в концентрации 10 мкМ приводила к значимому снижению уровня высвобождения β-гексозаминидазы, в то время как более низкие концентрации не вызывали такого эффекта (рис. 1Б).

На следующем этапе мы оценили влияние FCCP на уровень экспрессии генов цитокинов *IL-4* и *TNFα*. Анализ результатов данного эксперимента показал, что предварительная инкубация клеток RBL-2H3 с FCCP в концентрации 10 мкМ приводит к значимому снижению FcεRI-зависимой продукции мРНК гена *IL-4*, но не оказывает влияния на продукцию мРНК гена *TNF* (рис. 1В и 1Г).

Таблица 1

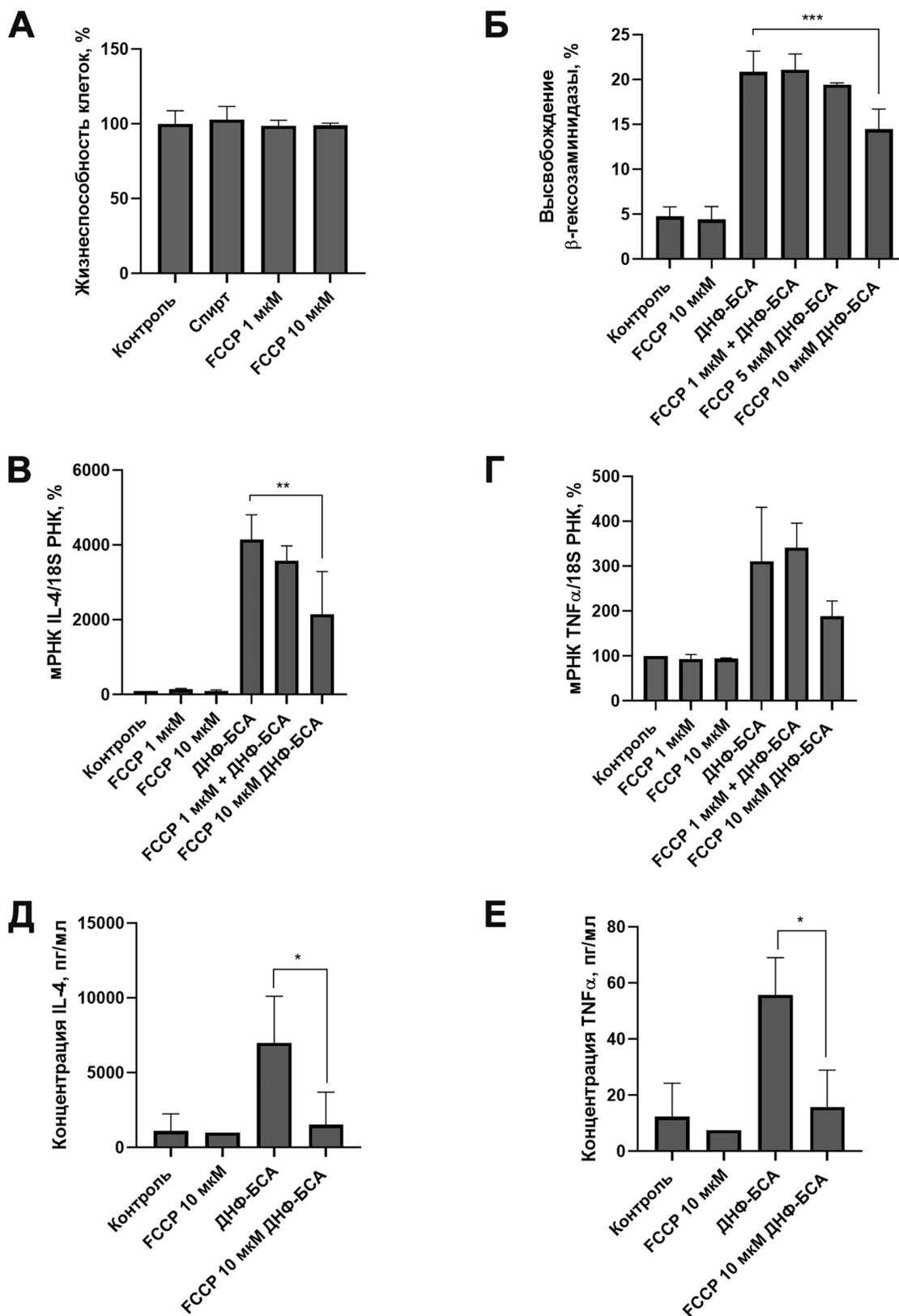
Последовательности праймеров для количественной ПЦР

Целевой ген	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>rIL-4</i>	TTACGGCAACAAGGAACAC	TTCTTCAAGCACGGAGGTA
<i>rTNF</i>	TTATCTACTCCCAGGTTCT	TGGTATGAAATGGCAAATC
<i>r18S</i>	GACAGGATTGACAGATTGAT	TTATCGGAATTAACCAGACAA

Таблица 2

Перечень антител, использованных для вестерн-блоттинга

Антиген	Производитель антител	Тип антител	Разведение
LAT	Cell Signaling Technology #45533	Кроличьи моноклональные	1:1000
Phospho-LAT (Tyr220)	Cell Signaling Technology #3584	Кроличьи поликлональные	1:1000
p38 MAPK	Cell Signaling Technology #9212	Кроличьи IgG	1:1000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology #4631	Кроличьи IgG	1:1000
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technology #4695	Кроличьи IgG	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology #4370	Кроличьи IgG	1:1000
PI3 Kinase p85	Cell Signaling Technology #4257	Кроличьи моноклональные IgG	1:500
Phospho-PI3 Kinase p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199)	Cell Signaling Technology #4228	Кроличьи поликлональные	1:500
Anti-Mouse IgG (Fab-specific)	Sigma-Aldrich A9917	Козьи поликлональные	1:30000
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)	Sigma-Aldrich A0545	Козьи поликлональные	1:30000



**Рис. 1.** FCCP подавляет FcεRI-зависимую активацию клеток линии RBL-2H3. Клетки сенсibilizировали мышинными моноклональными антителами изотипа IgE против динитрофенола в концентрации 0,2 мкг/мл в течение ночи. Далее клетки обрабатывали 1 и 10 мкМ FCCP в течение 2 ч, после чего стимулировали FcεRI-зависимую активацию путем добавления 1 мкг/мл динитрофенола, конъюгированного с бычьим сывороточным альбумином (ДНФ-БСА). Уровень дегрануляции определяли через 20 мин после стимуляции, уровень мРНК генов *IL-4* и *TNFα* – через 2 ч, концентрацию цитокинов *IL-4* и *TNFα* – через 24 ч. Влияние FCCP: А – на жизнеспособность клеток. Б – на уровень спонтанной (в отсутствие ДНФ-БСА) и ДНФ-БСА-индуцированной дегрануляции клеток. В–Г – на базовый (в отсутствие ДНФ-БСА) и ДНФ-БСА-индуцированный уровень мРНК генов *IL-4* (В) и *TNFα* (Г). Д–Е – на базовый (в отсутствие ДНФ-БСА) и ДНФ-БСА-индуцированный уровень цитокинов *IL-4* (Д) и *TNFα* (Е). Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n ≥ 3); \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

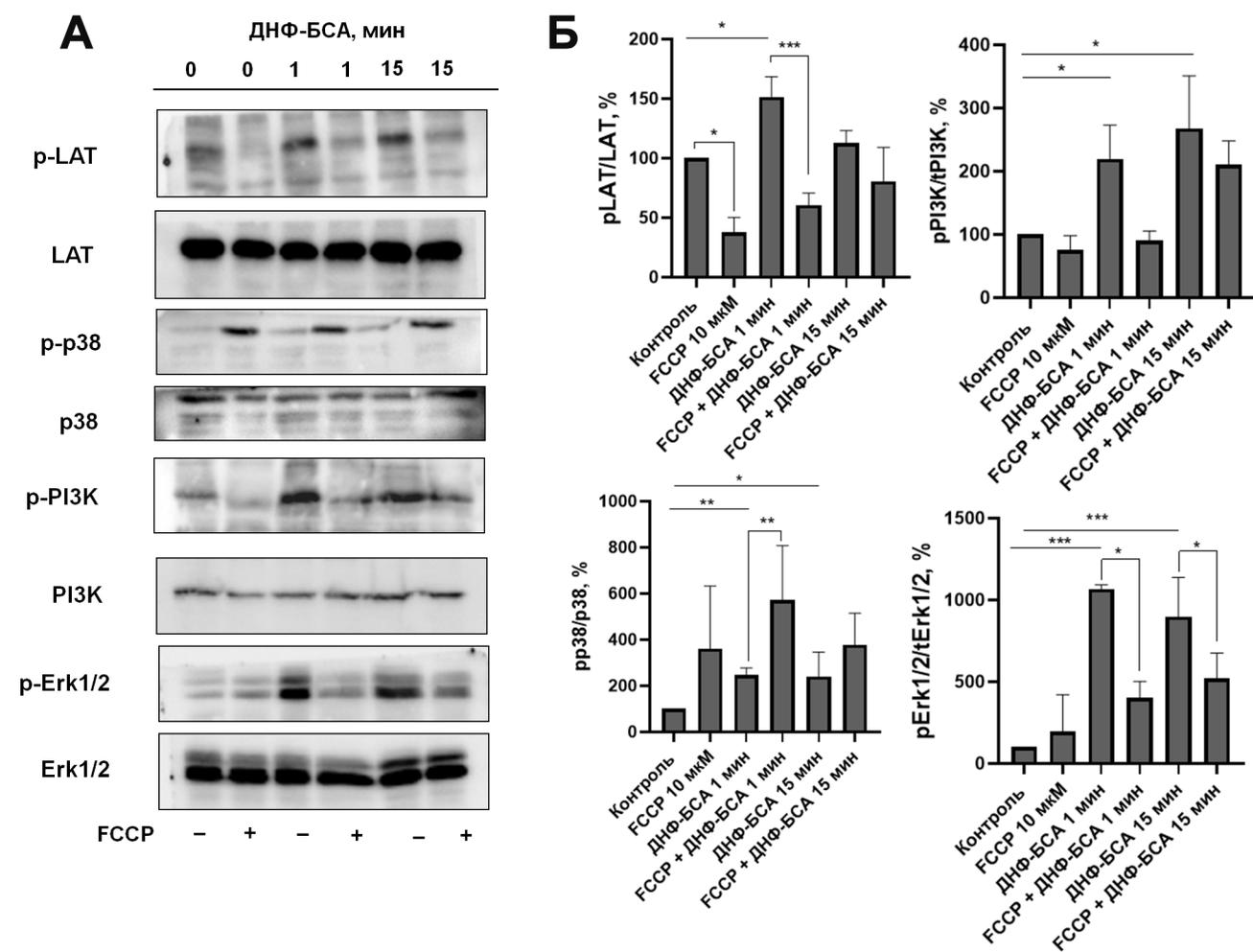
Более низкая концентрация не влияет на FcεRI-зависимое образование мРНК генов *IL-4* и *TNF*. В то же время результаты иммуноферментного анализа продемонстрировали ингибирующее влияние 10 мкМ FCCP на уровень FcεRI-зависимой секреции цитокинов IL-4 и TNFα (рис. 1Д и 1Е).

Для того чтобы выяснить механизм ингибирующего влияния FCCP на FcεRI-зависимую дегрануляцию клеток линии RBL-2H3 и секрецию ими цитокинов IL-4 и TNFα, мы проверили его действие на активацию ключевых компонентов FcεRI-зависимого сигналинга. Мы обнаружили, что предварительная инкубация клеток с FCCP в концентрации 10 мкМ приводит к снижению базового уровня фосфорилирования адаптерной молекулы LAT (линкерный белок для активации Т-клеток) (рис. 2). Фосфорилирование данной молекулы киназами Syk и Lyn приводит к сборке сигнального комплекса, активирующего фосфолипазу Cγ и Ca<sup>2+</sup>-зависимую дегрануляцию, а также активацию митоген-активируемых протеинки-

наз (MAPKs) — Erk1/2, p38 и JNK, что приводит к продукции цитокинов [15, 16].

Через 1 мин после стимуляции клеток ДНФ-БСА наблюдалось значимое увеличение уровня фосфорилирования адаптерной молекулы LAT, уже через 15 мин уровень фосфорилирования падал практически до уровня контроля. FCCP предотвращал увеличение фосфорилирования LAT (рис. 2). Кроме того, FcεRI-зависимая активация сопровождалась увеличением активности MAP-киназ Erk1/2 и p38, а также киназы PI3K уже через 1 мин после стимуляции и сохранялась через 15 мин (рис. 2). При этом FCCP значимо снижал уровень фосфорилирования киназы Erk1/2, не оказывал влияние на активность киназы PI3K и увеличивал уровень фосфорилирования киназы p38 (рис. 2).

Таким образом, FCCP снижает не только уровень FcεRI-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3, но и продукцию ими цитокинов IL-4 и TNFα, а также препятствует фосфорилированию адаптерной молекулы LAT и киназы Erk1/2.



**Рис. 2.** Влияние FCCP на ключевые компоненты FcεRI-зависимого сигналинга клеток линии RBL-2H3. Клетки сенсibilizировали мышинными моноклональными антителами изотипа IgE против динитрофенола в концентрации 0,2 мкг/мл в течение ночи. Далее клетки обрабатывали 1 и 10 мкМ FCCP в течение 2 ч, после чего вызывали FcεRI-зависимую активацию путем добавления 1 мкг/мл динитрофенола, конъюгированного с бычьим сывороточным альбумином (ДНФ-БСА) в течение 1 и 15 мин. А — Вестерн-блоттинг клеточных лизатов. Б — Гистограммы, отражающие относительное количество фосфорилированных форм белков. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n ≥ 3); #p ≤ 0,1, \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001.

### Обсуждение

ТК представляют собой важную популяцию клеток соединительной ткани, играющую критическую роль в поддержании ее гомеостаза. ТК являются важными участниками реакций, как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Эти клетки наиболее известны своим участием в IgE-ассоциированных реакциях гиперчувствительности немедленного типа и других аллергических заболеваниях. Основной тип активации ТК осуществляется путем взаимодействия антигенов с IgE и его последующим связыванием с высокоафинным рецептором FcεRI. Это приводит к запуску внутриклеточного FcεRI-сигналинга, экзоцитозу гранул с преформированными медиаторами и продукции вновь образованных медиаторов, к которым относятся метаболиты арахидоновой кислоты, цитокины, хемокины и факторы роста [17]. Связывание комплексов, состоящих из антигена и молекул IgE, с рецептором FcεRI приводит к фосфорилированию тирозинов в участках ITAM (тирозинсодержащие активационные последовательности остатков аминокислот) киназой Lyn из семейства киназ Src. Кроме того, Lyn активирует другую киназу из семейства Src – Syk. Субстратом для Syk является LAT, фосфорилирование которого инициирует сборку сигнального комплекса белков [15], что в конечном счете стимулирует фосфолипазу C $\alpha$  и Ca<sup>2+</sup>-зависимую дегрануляцию, а также активацию RAF-зависимого сигнального пути. В свою очередь это приводит к фосфорилированию и активации киназы Erk1/2 (киназы, регулируемой внеклеточным сигналом 1/2). Аналогичным образом увеличивается активность аминотерминальной киназы MAPK-каскада JUN (JNK) и p38 [16], но механизмы регуляции этих реакций изучены в меньшей степени. Все эти молекулы (Erk1/2, p38 и JNK), в свою очередь, активируют факторы транскрипции – включая компоненты белка-активатора 1 (AP1) FOS и JUN, ядерный фактор активированных T-клеток (NFAT) [15] и ядерный фактор-κB (NF-κB) [18]. Активация данных транскрипционных факторов ведет к продукции цитокинов. Каскад MAPK-киназ также участвует в регуляции FcεRI-индуцированной продукции липидных медиаторов (эйкозаноидов) через фосфолипазу A2, которая транслоцируется из цитозоля в ответ на увеличение содержания в нем Ca<sup>2+</sup> [19]. Существует также LAT-независимый путь активации ТК, осуществляемый киназой Fyn, фосфорилирующей адаптерную молекулу NTAL, в свою очередь активирующую фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K). Считается, что данный путь обеспечивает поддержание активированного состояния ТК [20].

В литературе имеются данные о роли мембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ) в FcεRI-зависимой активации мастоцитов. Так, использова-

ние классических разобщителей карбонилцианид-м-хлорфенилгидразона и FCCP ингибирует FcεRI-зависимую секрецию β-гексозаминидазы ТК *in vitro* [6, 7, 11]. Кроме того, антибактериальный и противогрибковый агент триклозан, обладающий разобщающей активностью, также снижал уровень дегрануляции ТК, но при этом увеличивал экспрессию цитокина TNFα [8, 9].

В нашей работе мы показали, что обработка клеток линии RBL-2H3 разобщителем FCCP не только снижает FcεRI-зависимую секрецию β-гексозаминидазы, но и снижает уровень мРНК гена цитокина IL-4, а также подавляет секрецию TNFα и IL-4 (рис. 1). Это свидетельствует о том, что FCCP снижает как уровень FcεRI-зависимой дегрануляции ТК, так и продукцию ими цитокинов. Результаты исследования активации ключевых сигнальных молекул, участвующих в FcεRI-зависимом сигналинге, показали, что FCCP препятствует фосфорилированию адаптерной молекулы LAT, а также киназы Erk1/2, что может лежать в основе ингибирующего влияния разобщителя на FcεRI-зависимую активацию клеток линии RBL-2H3. В литературе имеются данные о влиянии разобщения на регуляцию уровня активности Erk1/2. Как было написано выше, дефицит разобщающего белка митохондрий UCP2 в ТК костного мозга мышей приводит к повышению уровней FcεRI-зависимой дегрануляции, продукции IL-6 и простагландина D2, а также фосфорилирования Erk1/2 [21].

FCCP не оказывал значимого влияния на уровень фосфорилирования киназы PI3K, являющейся частью LAT-независимого пути, и увеличивал базовый уровень фосфорилирования MAP-киназы p38 (рис. 2). Однако через 15 мин после антигенной стимуляции данный эффект исчезал. Активация p38 под действием FCCP может происходить в результате активации киназы AMPK (AMP-activated protein kinase) [22, 23]. Так, известно, что активация киназы AMPK вследствие падения уровня АТФ является одним из первых и ключевых ответов клетки на разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания в митохондриях [24]. Кроме того, имеются сведения о том, что AMPK подавляет активность киназы Erk1/2 [25, 26]. Также интересно отметить, что AMPK является негативным регулятором FcεRI-зависимой активации ТК [27, 28]. Это могло бы вносить свой вклад в механизм ингибирующего влияния FCCP. Чтобы понять, является ли наблюдаемое в нашей системе увеличение уровня фосфорилирования киназы p38 следствием активации AMPK, требуются дополнительные эксперименты.

Еще одним эффектом разобщения может являться снижение генерации АФК [24]. Многие из молекул FcεRI-зависимого сигналинга являются АФК-чувствительными, в том числе LAT и Erk1/2 [29]. Наряду с другими тирозинфосфатазами, АФК окисляют активный центр SPH-2

и снижают тем самым ее каталитическую активность, что приводит к избыточному фосфорилированию ее мишеней-участников FcεRI-зависимого сигналинга, в частности Syk [30]. Также было показано, что продукция эндогенных АФК, наравне с экзогенными, повышает активность киназы Lyp, находящейся в самом начале каскада сигнальных белков [31].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что применение разобщителя FCCP приводит к снижению как уровня FcεRI-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3, так и секреции цитокинов IL-4 и TNFα, а также препятствует фосфорилированию компонентов

FcεRI-зависимого сигналинга – адаптерной молекулы LAT и киназы Erk1/2. Полученные данные свидетельствуют о том, что ΔΨm играет важную роль в FcεRI-зависимой активации ТК, а разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания митохондрий с помощью разобщителей может использоваться для регуляции этого процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00081). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. da Silva E.Z.M., Jamur M.C., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem.* 2014;62(10):698–738.
2. Krystel-Whittemore M., Dileepan K.N., Wood J.G. Mast cell: A multi-functional master cell. *Front. Immunol.* 2015;6:620.
3. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(7):478–494.
4. Pejler G., Hu Frisk J.M., Sjöström D., Paivandy A., Öhrvik H. Acidic pH is essential for maintaining mast cell secretory granule homeostasis. *Cell Death Dis.* 2017;8(5):e2785.
5. Kanagaratham C., El Ansari Y.S., Lewis O.L., Oettgen H.C. IgE and IgG antibodies as regulators of mast cell and basophil functions in food allergy. *Front. Immunol.* 2020;11:603050.
6. Mohr F. C., Fewtrell C. The relative contributions of extracellular and intracellular calcium to secretion from tumor mast cells. Multiple effects of the proton ionophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *J. Biol. Chem.* 1987;262(22):10638–10643.
7. Suzuki Y., Yoshimaru T., Inoue T., Ra C. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> flux is a critical determinant of the Ca<sup>2+</sup> dependence of mast cell degranulation. *J. Leukoc. Biol.* 2006;79(3):508–518.
8. Weatherly L.M., Shim J., Hashmi H.N., Kennedy R.H., Hess S.T., Gosse J.A. Antimicrobial agent triclosan is a proton ionophore uncoupler of mitochondria in living rat and human mast cells and in primary human keratinocytes. *J. Appl. Toxicol.* 2016;36(6):777–789.
9. Weatherly L.M., Nelson A.J., Shim J., Riitano A.M., Gerson E.D., Hart A.J., de Juan-Sanz J., Ryan T.A., Sher R., Hess S.T., Gosse J.A. Antimicrobial agent triclosan disrupts mitochondrial structure, revealed by super-resolution microscopy, and inhibits mast cell signaling via calcium modulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018;349:39–54.
10. Demine S., Renard P., Arnould T. Mitochondrial uncoupling: A key controller of biological processes in physiology and diseases. *Cells.* 2019;8(8):795.
11. Sagi-Eisenberg R., Pecht I. Resolution of cellular compartments involved in membrane potential changes accompanying IgE-mediated degranulation of rat basophilic leukemia cells. *EMBO J.* 1984;3(3):497–500.
12. Inoue T., Suzuki Y., Ra C. Epigallocatechin-3-gallate inhibits mast cell degranulation, leukotriene C4 secretion, and calcium influx via mitochondrial calcium dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 2010;49(4):632–640.
13. Rådinger M., Jensen B.M., Swindle E., Gilfillan A.M. Assay of mast cell mediators. *Mast cells. Methods in molecular biology, vol 1220.* Eds. M. Hughes and K. McNaghy. N.Y.: Humana Press; 2015:307–323.
14. Falcone F.H., Wan D., Barwary N., Sagi-Eisenberg R. RBL cells as models for *in vitro* studies of mast cells and basophils. *Immunol. Rev.* 2018;282(1):47–57.
15. Turner H., Kinet J.P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature.* 1999;402(6760):B24–B30.
16. Saitoh S.I., Odom S., Gomez G., Sommers C.L., Young H.A., Rivera J., Samelson L.E. The four distal tyrosines are required for LAT-dependent signaling in FcεRI-mediated mast cell activation. *J. Exp. Med.* 2003;198(5):831–843.
17. Fitzsimmons C.M., Falcone F.H., Dunne D.W. Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity. *Front. Immunol.* 2014;5:61.
18. Marquardt D.L., Walker L.L. Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor-κB activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;105(3):500–505.
19. Murakami M., Taketomi Y. Secreted phospholipase A2 and mast cells. *Allergol. Int.* 2015;64(1):4–10.
20. Gilfillan A.M., Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol. Rev.* 2009;228(1):149–169.
21. Tagen M., Elorza A., Kempuraj D., Boucher W., Kopley C.L., Shirihai O.S., Theoharides T.C. Mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits mast cell activation and reduces histamine content. *J. Immunol.* 2009;183(10):6313–6319.
22. Li J., Miller E.J., Ninomiya-Tsuji J., Russell R.R., Young L.H. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ. Res.* 2005;97(9):872–879.
23. Lanna A., Henson S.M., Escors D., Akbar A.N. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat. Immunol.* 2014;15(10):965–972.
24. Demine S., Renard P., Arnould T. Mitochondrial uncoupling: a key controller of biological processes in physiology and diseases. *Cells.* 2019;8(8):795.
25. Tong S., Zhou T., Meng Y., Xu D., Chen J. AMPK decreases ERK1/2 activity and cancer cell sensitivity to nutrition deprivation by mediating a positive feedback loop involving eEF2K. *Oncol. Lett.* 2020;20(1):61–66.

26. Meng R., Pei Z., Zhang A., Zhou Y., Cai X., Chen B., Liu G., Mai W., Wei J., Dong Y. AMPK activation enhances PPAR $\alpha$  activity to inhibit cardiac hypertrophy via ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011;511(1–2):1–7.

27. Hwang S.L., Li X., Lu Y., Jin Y., Jeong Y.T., Kim Y.D., Lee I.K., Taketomi Y., Sato H., Cho Y.S., Murakami M., Chang H.W. AMP-activated protein kinase negatively regulates Fc $\epsilon$ RI-mediated mast cell signaling and anaphylaxis in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;132(3):729–736.

28. Lin K.C., Huang D.Y., Huang D.W., Tzeng S.J., Lin W.W. Inhibition of AMPK through Lyn-Syk-Akt enhances Fc $\epsilon$ RI signal pathways for allergic response. *J. Mol. Med.* 2016;94(2):183–194.

29. Chelombitko M.A., Fedorov A.V., Ilyinskaya O.P., Zinovkin R.A., Chernyak B.V. Role of reactive oxygen species in mast cell degranulation. *Biochemistry (Mosc.)* 2016;81(12):1564–1577.

30. Jang J. Y., Min J.H., Chae Y.H., Baek J.Y., Wang S.B., Park S.J., Oh G.T., Lee S.H., Ho Y.S., Chang T.S. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via SHP-2 oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* 2014;20(16):2528–2540.

31. Yoo S.K., Starnes T.W., Deng Q., Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction *in vivo*. *Nature.* 2011;480(7375):109–112.

Поступила в редакцию 18.03.2023

После доработки 05.05.2023

Принята в печать 10.05.2023

## RESEARCH ARTICLE

# Effect of 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone carbonyl cyanide (FCCP) on Fc $\epsilon$ RI-dependent cytokine production by RBL-2H3 cells

A.N. Pavlyuchenkova<sup>1,2</sup> , M.S. Smirnov<sup>1,2</sup> , M.A. Chelombitko<sup>1,3,\*</sup> 

<sup>1</sup>*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russia;*

<sup>2</sup>*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 1–73 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russia*

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

Mast cells (MCs) play a key role in the development of allergic diseases. The interaction of antigens with immunoglobulin E and the subsequent binding of these complexes to the Fc $\epsilon$ RI receptor, which ultimately leads to rapid exocytosis of granules and subsequent production of cytokines, play a major role in MC activation in allergy. There is data on the role of the mitochondrial membrane potential in the Fc $\epsilon$ RI-dependent activation of MC. Thus, the use of classical uncouplers of oxidative phosphorylation reduces MC degranulation. However, their effect on the production of MC cytokines has not been studied. In the present work, it was demonstrated that pretreatment of RBL-2H3 mast cells with the uncoupler carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) leads to a decrease not only in Fc $\epsilon$ RI-dependent degranulation, but also in a decrease in the production of TNF $\alpha$  and IL-4 cytokines. At the same time, FCCP prevents the phosphorylation of the LAT adapter molecule, as well as the Erk1/2 kinase, which may underlie the inhibitory effect of the uncoupler on Fc $\epsilon$ RI-dependent activation of RBL-2H3 cell line. The data obtained indicate that the mitochondrial membrane potential plays an important role in the Fc $\epsilon$ RI-dependent activation of MC, and the uncoupling of oxidative phosphorylation and respiration of mitochondria with the help of uncouplers can be used to regulate this process.

**Keywords:** mast cells, uncouplers, mitochondria, allergy, Fc $\epsilon$ RI-dependent activation, FCCP

**Funding:** The research was supported by Russian Science Foundation (project No 22-74-00081).

### Сведения об авторах

*Павлюченкова Анастасия Никитична* – аспирантка факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, инженер 1-й категории отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: anabella.gen@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3694-8007>

*Смирнов Максим Сергеевич* – студент факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, ст. лаборант отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: maksimsmirnov1028@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-8897-1517>

*Челомбитко Мария Александровна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3902-7812>

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.21+575.826+575.167

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

А.Р. Лавренов<sup>1, 2, \*</sup> , Т.А. Мышлявкина<sup>1, 2</sup>, Н.В. Умнова<sup>2</sup> ,  
А.И. Ким<sup>1, 3</sup> , В.С. Румак<sup>1, 2</sup> 

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для оценки опасности диоксинов обоснованы санитарно-гигиенические нормативы, в том числе допустимого поступления в организм человека (по данным ВОЗ<sub>(1998)</sub> 1–4 пг/г в перерасчете на ТХДД, в России – 10 пг/г) и загрязнения сред (почв, воздуха и т. д.). В последнем случае величины санитарно-гигиенических нормативов или ориентировочно безопасного уровня воздействия (ОБУВ) для России в большинстве случаев оказались значимо выше принятых в зарубежных странах. Например, отечественный ОБУВ для почв сельскохозяйственных угодий в России составил 5,0 нг/кг<sup>1</sup> против допустимых концентраций в почвах США – 0,1 нг/кг, в Германии – 1,0 нг/кг, в Нидерландах – 4,0 нг/кг [2]. Подобные различия отмечены относительно атмосферного воздуха (Россия – 0,5 пг/м<sup>3</sup> – ГН-2.1.6.014-94; США – 0,02 пг/м<sup>3</sup>, Нидерланды – 0,24 пг/м<sup>3</sup> [2]) и питьевой воды (Россия – 20 пг/л; приказ МЗ СССР №142-9/105 от 05.05.1991<sup>2</sup>; США – 0,013 пг/дм<sup>3</sup>). Между тем, эти нормативы далеко не в полной мере учитывают влияние факторов реальных условий экспозиции на проявления токсических свойств. Наилучшие условия для учета большинства факторов предоставляет биомониторинг с использованием млекопитающих. Перспективы применения мелких млекопитающих для выявления и характеристики ряда генетических процессов, происходящих в природных популяциях рыжих полевков, обитающих на загрязненных диоксинами территориях в окрестностях свалок, показаны нами ранее [6]. Этот начальный по своей

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

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

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

### Материалы и методы

Исследованы две выборки животных из природной популяции рыжей полевки (*Clethrionomys (Myodes) glareolus* Schreb 1780), обитающей на загрязненных диоксинами территориях. Концентрации в тканях составляли – WHO-TEQ<sub>05</sub> в среднем 2,1 (0,4–13,0) пг/г, сухого веса; ТХДД 0,2 (0,07–0,3) пг/г сухого веса [14]). Зоны отлова расположены в ≈ 1,5 км от границ санитарной зоны законсервированного полигона твердых бытовых отходов (ТБО) «Саларьево» (г. Москва). Обследованы выборки из различных по показателям загрязнения диоксинами функциональных группировок полевков зимнего и летнего сезонов. В ходе проводимых ранее исследований показано, что у представляющих функциональную группировку зимнего сезона животных концентрации диоксинов (WHO-TEQ<sub>05</sub>) оказались меньше, чем у полевков летнего сезона –

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

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

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

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

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

Таблица 1

Общая характеристика обследованного биоматериала

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

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

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

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

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

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

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

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

## Результаты и обсуждение

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

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

Таблица 2

Список генов и праймеров, использованных в работе

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

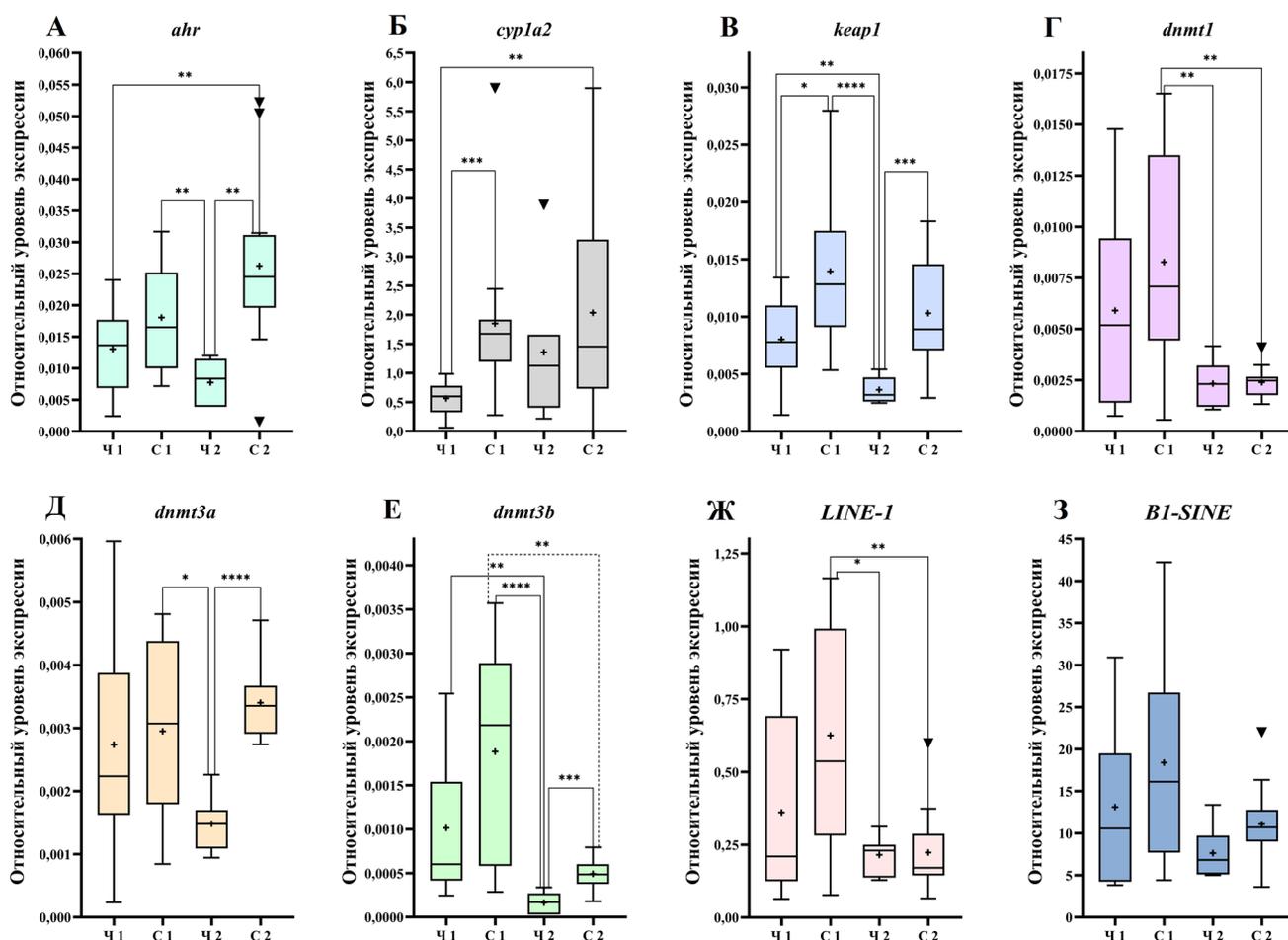


Рисунок. Сравнение относительных уровней экспрессии генов *ahr*, *cyp1a2*, *keap1*, *dnmt1*, *dnmt3a*, *dnmt3b*, *LINE-1* и *B1-SINE* у рыжих полевок с помощью критерия Манна-Уитни. Линия в середине ящика – медиана, границы ящика – первый и третий квартили, «усы» – размах, ▼ – выбросы, + – среднее; \*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

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

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

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

Возможность ассоциации рассматриваемых нами поглощенных животными доз с экологически значимыми (малыми) определяется тем, что их количественные значения находятся в диапазоне типичных для жителей многих городов России нагрузок диоксинами [22–24], а также не превышают санитарно-гигиенические и экологические нормативы<sup>3</sup>.

#### **Функциональная группировка летнего сезона.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Поступила в редакцию 13.03.2023

После доработки 07.05.2023

Принята в печать 22.05.2023

## RESEARCH ARTICLE

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

A.R. Lavrenov<sup>1, 2, \*</sup> , T.A. Myshliavkina<sup>1, 2</sup>, N.V. Umnova<sup>2</sup> ,  
A.I. Kim<sup>1, 3</sup> , V.S. Roumak<sup>1, 2</sup> 

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

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

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

\*e-mail: overtaki@mail.ru

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

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

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

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

#### Сведения об авторах

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

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

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

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

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

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 582.594:581.16(470.13)

**Жизнь на краю ареала: сравнительное изучение центральных и краевых популяций *Dactylorhiza traunsteineri* (Orchidaceae) на европейском северо-востоке России**И.А. Кириллова\* , Д.В. Кириллов *Институт биологии Коми научного центра, Уральское отделение Российской Академии наук, Россия, 167000, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28**\*e-mail: kirillova\_orchid@mail.ru*

Периферийные популяции считаются более уязвимыми, чем центральные, однако недавние исследования поставили под сомнение существование четких закономерностей в пределах ареалов видов. Мы изучили репродуктивные и демографические характеристики редкой орхидеи *Dactylorhiza traunsteineri* на северо-восточном пределе ее распространения (Приполярный Урал) и сравнили их с данными четырех популяций, находящихся ближе к центру ареала этого вида (юг Республики Коми). Значения численности популяций, размеров растений, числа цветков на особь и семян в плоде в периферийных популяциях были достоверно ниже, чем в популяциях, расположенных ближе к центру ареала. Вопреки ожиданиям, периферийные популяции возобновлялись лучше, чем центральные популяции, что, возможно, связано с высоким уровнем влагообеспеченности территории Приполярного Урала. Доля ювенильных особей в периферийных популяциях составила 18,7%, в популяциях на юге Республики Коми – 6,3–6,9%. Кроме того выявлено, что в направлении от центра к периферии ареала увеличивается доля пустого пространства в семенах (с 63,9 до 75,6%). Это обеспечивает им лучшую летучесть и повышает шансы достичь благоприятных для прорастания мест, которых на краю ареала становится меньше.

**Ключевые слова:** орхидные, граница ареала, репродуктивный успех, структура популяции, Республика Коми, морфометрия семян

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-9

Каждый вид занимает ограниченную географическую область – ареал. Идея о том, что популяции в центре ареала и на его окраинах отличаются, является фундаментальным принципом экологии и биогеографии [1]. Существует гипотеза «обильного центра», согласно которой виды в центре ареала чаще всего населяют большее разнообразие типов местообитаний, тогда как по краям они в основном произрастают в ограниченном спектре растительных сообществ [2]. Считается, что условия окружающей среды являются оптимальными вблизи центра ареала и более суровыми на периферии, поэтому индивидуальная приспособленность и показатели демографии снижаются от центра к окраинам ареала [3]. Краевые популяции из-за изоляции и ограничений, вызванных экстремальными условиями среды обитания, считаются более уязвимыми по сравнению с популяциями, встречающимися в центре ареала. Ряд исследований показали более низкие показатели жизнедеятельности на границе ареала [4, 5], тогда как другие не обнаружили ожидаемых различий [6, 7].

Виды семейства орхидные являются своеобразными «индикаторами» состояния экосистем [8] и первыми выпадают из состава фитоценозов при любых антропогенных нарушениях. Для успешного сохранения природных популяций этих уязвимых растений необходимы всесторонние исследования их биологии и экологии [9]. Особенно актуальны такие исследования близ границ ареалов видов, где они существуют на пределе своих биологических возможностей.

*Dactylorhiza traunsteineri* (Saut. ex Rchb.) Soó [10] – редкий вид семейства орхидные, включенный в Красную книгу Российской Федерации [11], однако на ее территории практически не исследован [12]. Данные по виду представлены лишь в публикации И.В. Блиновой [13] по Мурманской области и в исследовании, посвященном динамике одной популяции этого вида в Республике Коми [14]. Кроме того, есть несколько работ по разным вопросам биологии близкого вида – *D. lapponica* (Laest. ex Hartm.) Soó, который иногда рассматривают в составе *D. traunsteineri* s. l., выполненных на территории Норвегии [15, 16].

Целью данной работы стала оценка состояния периферийных популяций этого вида, расположенных на северо-восточном пределе распространения, и сравнение их демографических показателей с показателями популяций, находящихся ближе к центру ареала в пределах территории Республики Коми.

### Материалы и методы

*D. traunsteineri* – редкая орхидея, охраняемая во многих европейских странах и в 26 регионах России [12]. Преимущественно европейский вид (рисунок). Растет на открытых сфагновых болотах переходного и низинного типа с повышенным минеральным питанием и на ключевых болотах. В Республике Коми находится на северо-восточной границе своего распространения. Произрастает на травяно-сфагновых, осоково-гипново-сфагновых и травяно-гипновых болотах [17].

Исследования проводили в 2022 г. на трех участках территории Республики Коми (рисунок), расположенных по градиенту юг–север. Первый участок находился в подзоне южной тайги, на территории Прилузского административного района, в пределах Северных увалов. Здесь исследована одна популяция (№ 1, табл. 1), самая южная из изученных нами. Среднегодовая температура воздуха составляет на данной территории  $+1,1^{\circ}\text{C}$ , количество осадков за год – 622 мм, продолжительность вегетационного периода 106 сут [18].

Второй участок расположен в подзоне средней тайги, на территории Сыктывдинского административного района, в пределах Вычегодско-Ме-

зенской равнины. Климат района умеренно континентальный, среднегодовая температура воздуха  $+0,4^{\circ}\text{C}$ , количество осадков за год 560 мм, продолжительность вегетационного периода 100 сут [19]. На данном участке исследовано три популяции вида (№ 2–4, табл. 1), в популяции № 2 с 2014 г. ведутся мониторинговые исследования [14].

Третий участок расположен на северо-востоке Республики Коми, в подзоне северной тайги на Приполярном Урале. В административном отношении он входит в состав Вуктыльского административного района (национальный парк «Югыд ва»). Климат здесь резко континентальный, с преобладанием холодного времени над умеренно теплым. Это обусловлено географическим положением и наличием горных хребтов меридионального направления, вдоль которых с севера на юг проникают холодные арктические массы воздуха. Среднегодовая температура воздуха  $-4,5^{\circ}\text{C}$ . Количество осадков более 1000 мм за год [18]. Вегетационный период длится 60–75 сут. На данной территории исследовали четыре популяции вида (№ 5–8, табл. 1), они находятся на северо-восточном краю его ареала.

При изучении популяций *D. traunsteineri* использовали общепринятые в популяционной биологии методики с учетом специфики изучения редких видов [20]. В каждой популяции были заложены трансекты ( $1 \times 10 \text{ м}^2$ ), по 2–3 для каждой популяции. Трансекты разбивали на учетные площадки по  $1 \text{ м}^2$ . На каждой учетной площадке подсчитывали число особей изучаемого вида, определяли его плотность и онтогенетическую

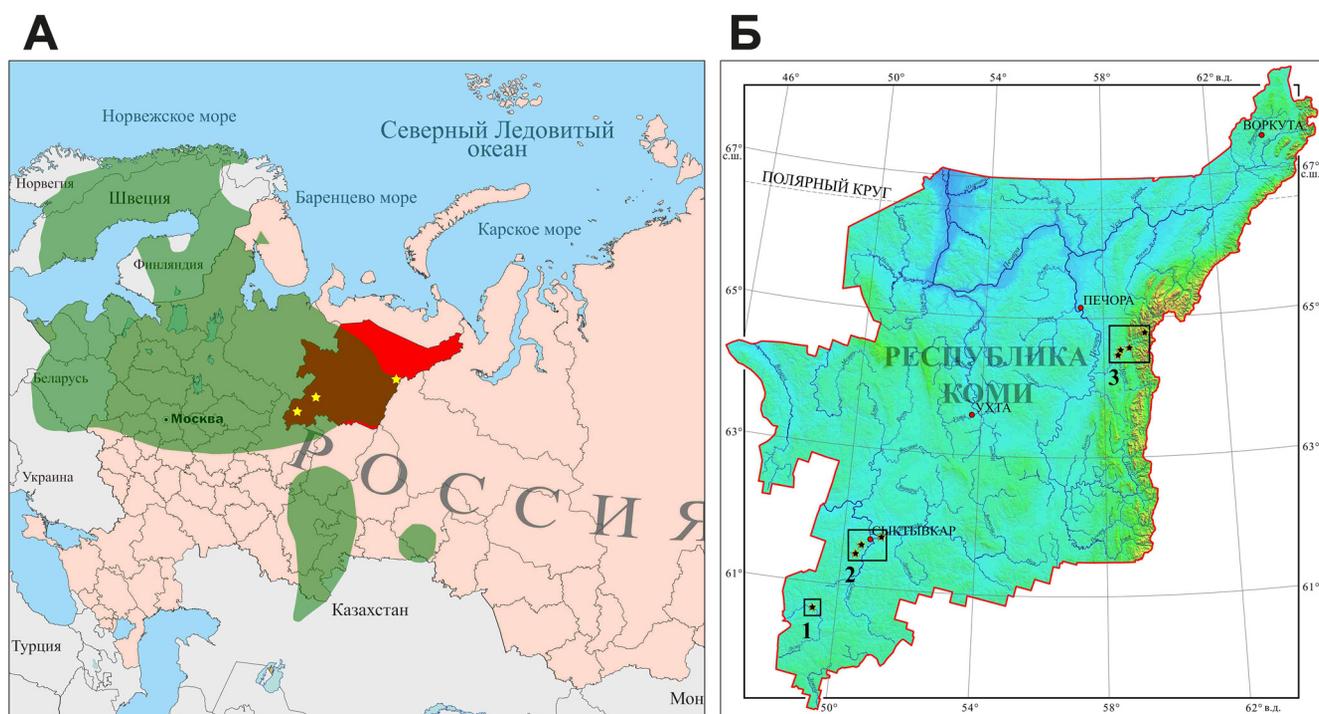


Рисунок. Ареал *Dactylorhiza traunsteineri* (отмечен зеленым цветом) (А) и локализация изученных популяций вида (черные звездочки) на территории Республики Коми (Б), цифрами обозначены участки исследований.

структуру популяций. Условные онтогенетические состояния растений выделены по ранее разработанным для данного вида ключам [14]. Выделяли следующие онтогенетические состояния: ювенильное (j) (растения с одним листом срединной формации с 2–4 жилками), имматурное (im) (растения с 1–2 листьями срединной формации с 6–8 жилками), взрослое вегетативное (v) (2–3 листа с 8–12 жилками) и генеративное (g) (цветущие растения).

Во время плодоношения подсчитывали количество завязавшихся плодов и собирали коробочки со зрелыми семенами из центральной части соцветия до начала их раскрытия. Семена просматривали при увеличении 4,5× под световым микроскопом МСП-2 (ЛОМО, Россия) и фотографировали цифровой видеокамерой ТС-500 (ЛОМО, Россия). Измерения проводили в программе TourView (TourTek, Китай). Анализировали среднюю длину и ширину семени и зародыша, отношение этих показателей друг к другу, объем семени и зародыша, долю воздушного пространства в семени [21, 22] у 40 выполненных семян из каждой популяции.

Для определения качества семян взята смесь семян из коробочек, отобранных с разных растений в пределах одной популяции (не менее 600 семян с каждой популяции). Семена просматривали под микроскопом, неполноценными считали семена без нормально развитого зародыша. Подсчет числа семян в коробочках проведен с применением разработанной нами оригинальной методики абсолютного учета количества семян средствами программного пакета ImageJ 1.53t [23] на сканированном материале в автоматическом режиме (алгоритм Find Maxima) с ручной корректировкой. Для каждой популяции подсчитаны семена в 5–7 коробочках из средней части соцветия.

Подготовительную обработку и анализ данных проводили в приложении Microsoft Office Excel 2010. Статистические расчеты выполнены с помощью среды R (v.3.6.3) [24]. Проверку на нормальность распределения выборок значений морфометрических параметров растений и семян проводили с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Для сравнения выборок использовали две группы методов: параметрические (t-критерий Стьюдента для выборок с нормальным распределением) и непараметрические (критерий Уилкоксона–Манна–Уитни для данных с отклонениями от нормального распределения).

### Результаты

Наши исследования показали, что численность популяций *D. traunsteineri* на юге Республики Коми (участки 1–2) высокая – свыше 1000 растений, плотность – 5–20 особей на 1 м<sup>2</sup>. Самая большая популяция (№ 2) насчитывает 23722 растения [14]. Краевые популяции на Приполярье Урале (участок 3) характеризуются меньшей численностью – 100–500 особей, при средней плотности размещения 8–18 экземпляров на 1 м<sup>2</sup>.

Все изученные нами популяции *D. traunsteineri* – нормальные, полночленные. В табл. 2 представлены усредненные онтогенетические спектры популяций вида с разных частей Республики Коми. На юге региона в популяциях преобладают взрослые вегетативные растения, при большом числе генеративных особей. В онтогенетических спектрах популяций вида на Приполярье Урале преобладают генеративные и имматурные особи. Кроме того, они отличаются повышенной долей молодых растений. Ювенильные особи присутствовали во всех изученных нами популяциях на территории Республики Коми, в краевых популяциях их доля оказалась выше (18,7%), чем в популяциях с юга региона (6,3–6,9%).

Таблица 1

Местонахождения изученных популяций *Dactylorhiza traunsteineri* в Республике Коми

№	Местонахождение	Координаты	Местообитание
1	Окрестности деревни Занулье	60,6275° с.ш. 49,4203° в.д.	Вахтово-сфагновое болото
2	Пойма реки Тылаю	61,5927° с.ш. 50,6244° в.д.	Вахтово-осоково-гипновое болото
3	Пойма реки Юил	61,5161° с.ш. 50,4323° в.д.	Вахтово-осоково-сфагновое болото с ерником
4	Истоки реки Фирма	61,6698° с.ш. 51,0488° в.д.	Вахтово-гипново-сфагновое болото
5	Правый берег реки Большой Паток, 600 м ниже ручья Лиственичный	64,7417° с.ш. 59,2857° в.д.	Пушицево-гипново-сфагновое болото
6	Правый берег реки Большой Паток, 3 км выше устья реки Седью	64,5630° с.ш. 58,8087° в.д.	Хвощово-осоково-сфагновое болото
7	Левый берег реки Большой Паток, 400 м ниже острова Кузьлынди	64,5111° с.ш. 58,5245° в.д.	Разнотравно-осоково-гипновое болото
8	Левый берег реки Большой Паток, 1 км выше острова Давди	64,4991° с.ш. 58,5045° в.д.	Пушицево-осоково-гипновое болото

В трех из четырех исследованных популяциях вида на Приполярном Урале отмечены поврежденные генеративные особи, их доля составила 6–15%. На самом юге Республики Коми (участок 1) поврежденных генеративных растений не обнаружено. На участке 2 такие особи отмечены лишь в одной популяции, где ведутся мониторинговые исследования (в 2015 г. после заморозков в начале октября предыдущего года 7% генеративных растений оказались повреждены).

Усредненные морфометрические параметры растений *D. traunsteineri* с разных частей Республики Коми приведены в табл. 3. Наши исследования показали, что в направлении с юга на север происходит значимое уменьшение размеров растений и числа цветков (при  $p < 0,05$ ).

Завязываемость плодов варьирует в разных популяциях от 14 до 69% (табл. 2). Не выявлено достоверной корреляции между этим показателем и числом цветков в соцветии. Размеры семян в крайних популяциях *D. traunsteineri* значимо больше,

чем в расположенных южнее: длина семени на самом юге региона составляет 0,67 мм, в крайних популяциях – 0,73 мм, ширина – 0,19 и 0,21 мм соответственно (табл. 3). Выявлено, что в направлении от центра к периферии ареала у растений в изученных популяциях увеличивается доля пустого воздушного пространства – от 63,9 до 75,6%, отношение длины семени к его ширине не меняется, а зародыш становится более вытянутым (табл. 3).

На самом юге Республики Коми в коробочке *D. traunsteineri* образуется в среднем  $5233 \pm 433$  семян, в пределах средней тайги –  $4472 \pm 563$  шт., а на Приполярном Урале –  $4222 \pm 386$  шт. Часть семян в коробочках – неполноценная, не содержит нормально развитый зародыш. Доля таких семян в изученных нами популяциях невелика – не превышает 4,9% (табл. 2). Реальная семенная продуктивность генеративной особи максимальна на участке 2 – 29 740 семян. На самом юге региона и на Приполярном Урале на растение приходится в среднем 20 тыс. семян.

Таблица 2

**Онтогенетические спектры и репродуктивные характеристики популяций *Dactylorhiza traunsteineri* на трех участках Республики Коми**

Признак	Участок 1	Участок 2	Участок 3
Усредненные онтогенетические спектры популяций (j:im:v:g)	6,9:18,5:38,6:36,0	6,3:15,3:41,6:36,8	18,7:29,8:19,8:31,7
Завязываемость плодов, %	26,9	46,2 (28,5–69,1)	28,8 (13,3–47,8)
Среднее число семян в коробочке, шт.	5233	4472	4221
Доля неполноценных семян, %	3,3	4,9	3,0
Реальная семенная продуктивность особи, шт.	19 057	29 740	20 277

Таблица 3

**Морфометрические параметры растений и семян *Dactylorhiza traunsteineri* на трех участках Республики Коми**

Признак	Участок 1	Участок 2	Участок 3	Уровень значимости		
	1	2	3	1-2	2-3	1-3
Высота растения, см	25,28±3,44	21,83±4,33	20,93±3,70	**	**	**
Длина соцветия, см	5,11±1,13	4,91±1,14	4,82±1,46	—	—	—
Число листьев, шт.	2,78±0,48	3,01±0,37	2,55±0,52	**	**	**
Длина нижнего листа, см	8,09±1,80	7,61±1,97	5,17±1,56	*	**	**
Ширина нижнего листа, см	1,57±0,32	1,24±0,29	1,13±0,26	**	**	**
Длина второго листа, см	8,99±1,80	9,35±1,71	6,54±1,66	—	**	**
Ширина второго листа, см	1,45±0,39	1,22±0,30	1,07±0,28	**	**	**
Число цветков, шт.	13,8±3,60	14,87±4,92	11,26±4,05	—	**	**
Длина семени, мм	0,67±0,07	0,71±0,10	0,73±0,11	**	—	**
Ширина семени, мм	0,19±0,03	0,21±0,03	0,21±0,03	**	—	**
Длина зародыша, мм	0,21±0,02	0,23±0,03	0,22±0,05	**	**	*
Ширина зародыша, мм	0,14±0,02	0,15±0,02	0,13±0,03	**	**	**
Отношение длины семени к ширине	3,55±0,70	3,51±0,73	3,52±0,80	—	—	—
Отношение длины зародыша к ширине	1,56±0,14	1,60±0,18	1,71±0,27	—	**	**
Объем семени $\times 10^{-3}$ , мм <sup>3</sup>	6,65	8,34	8,94	**	—	**
Объем зародыша $\times 10^{-3}$ , мм <sup>3</sup>	2,20	2,74	2,15	**	**	*
Доля пустого воздушного пространства в семени, %	63,88	65,07	75,65	*	**	**

Примечание: В таблице приведены среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD).

«—» — различия недостоверны; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$

### Обсуждение

Границы ареала вида часто совпадают с экологическими границами. Поэтому виды достигают здесь предела своей экологической толерантности и плохо адаптируются к условиям вне ареала. В связи с этим численность популяций видов с удалением от центра ареала уменьшается в ответ на все более неблагоприятную окружающую среду [25]. По территории Республики Коми проходит северо-восточная граница распространения *D. traunsteineri* и обследованные нами популяции на Приполярном Урале можно отнести к самым крайним точкам его ареала. Численность этих популяций ниже, чем на юге Республики Коми, но сопоставима с данными для Центральной Норвегии [26, 16], где популяции насчитывают 400–500 цветущих растений.

В результате снижения благоприятности окружающей среды при продвижении от центра к периферии ареала возрастает уровень экологического стресса [27]. Следствием этого может быть уменьшение энергии, доступной для роста и размножения, при приближении к краю ареала, и, следовательно, уменьшение размеров растений и снижение производства семян [5]. Уменьшение морфометрических параметров растений и числа цветков также отмечено нами в периферийных популяциях *D. traunsteineri* на Приполярном Урале, по сравнению с более южными популяциями вида на территории Республики Коми.

В большинстве изученных краевых популяций *D. traunsteineri* отмечены поврежденные заморозками генеративные особи, по направлению к югу Республики Коми их число уменьшается. То есть низкие температуры на северо-восточной границе ареала влияют и на количество цветущих растений этого вида.

Эффективность опыления *D. traunsteineri* не связана с нахождением в разных точках ареала. Она сильно варьирует в разных популяциях и зависит от погодных условий во время цветения вида, а также конкретных условий фитоценоза. Средняя завязываемость плодов *D. traunsteineri* в краевых популяциях на Приполярном Урале (28,8%) сопоставима с данными из Центральной Норвегии и Мурманской области, где этот показатель не превышает 30% [13, 15]. В более южных популяциях, в Московской области, он составляет 10–15% и только в особо благоприятные годы достигает 60–65% [12].

Отмечено небольшое снижение семенной продуктивности в направлении от центра к краю ареала *D. traunsteineri*. Сокращение производства семян на северной границе ареала отмечено и для некоторых других видов орхидных, например *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser [28],

*D. incarnata* (L.) Soó [29] и *D. fuchsii* (Druce) Soó [30]. Размер семян *D. traunsteineri* на территории Республики Коми при продвижении на север, напротив, увеличивается, в основном за счет увеличения доли пустого воздушного пространства в семени. В Мурманской области, где проходит северная граница ареала *D. traunsteineri*, семена этого вида еще крупнее, их размер составляет  $0,89 \times 0,27$  мм [13]. Известно, что увеличение объема воздушной прослойки в семенах повышает их парусность и плавучесть и, следовательно, расширяет зону их возможного распространения с помощью воды и ветра [31]. Возможно, это является приспособлением к лучшему распространению, так как на границе ареала подходящих мест для прорастания становится меньше. Подобная закономерность обнаружена и для другого представителя рода *Dactylorhiza* (*D. maculata* (L.) Soó) на северной границе ареала [32]. Снижения качества семян на границе ареала, описанного для некоторых видов [6], для *D. traunsteineri* не отмечено.

Конечным показателем репродуктивного успеха вида на уровне популяции является число появившихся и закрепившихся молодых растений [20]. Доля ювенильных особей оказалась выше в периферийных популяциях *D. traunsteineri* на Приполярном Урале, чем в более южных популяциях вида. Подобная закономерность описана и для *Plantago coronopus* L. на северной границе ареала [33]. Возможно, это связано с тем, что среднегодовое количество осадков на территории, где находятся краевые популяции *D. traunsteineri* (участок 3) в два раза выше (1000 мм), чем в более южных частях (560–620 мм). А наши предыдущие исследования [14] показали, что уровень влагообеспеченности является основным фактором, положительно влияющим на репродуктивный успех этого вида.

Таким образом, нами показано, что, несмотря на ряд свойств изученных краевых популяций *D. traunsteineri* (уменьшение размеров растений, числа цветков и семян, снижение численности популяций, повреждение заморозками генеративных растений), местообитания на периферии ареала могут быть благоприятными для этого вида — по крайней мере, для некоторых показателей жизнедеятельности. Так, здесь выше число молодых (ювенильных) растений, что свидетельствует о благоприятных условиях для семенного возобновления, основного у этого вида.

Работа выполнена в рамках госзадания Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (№ 122040600026-9). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pironon S., Papuga G., Vilellas J., Angert A.L., García M.B., Thompson J. Geographic variation in genetic and demographic performance: new insights from an old biogeographical paradigm. *Biol. Rev.* 2017;92(4):1877–1909.
2. Sagarin R.D., Gaines S.D. The ‘abundant centre’ distribution: to what extent is it a biogeographical rule? *Ecol. Lett.* 2002;5(1):137–147.
3. Abeli T., Gentili R., Mondoni A., Orsenigo S., Rossi G. Effects of marginality on plant population performance. *J. Biogeogr.* 2014;41(2):239–249.
4. Tremblay M.F., Bergeron Y., Lalonde D., Mauffette Y. The potential effects of sexual reproduction and seedling recruitment on the maintenance of red maple (*Acer rubrum* L.) populations at the northern limit of the species range. *J. Biogeogr.* 2002;29(3):365–373.
5. Jump A.S., Woodward F.I. Seed production and population density decline approaching the range-edge of *Cirsium* species. *New Phytol.* 2003;160(2):349–358.
6. García M.B., Goni D., Guzmán D. Living at the edge: Local versus positional factors in the long-term population dynamics of an endangered orchid. *Conserv. Biol.* 2010;24(5):1219–1229.
7. Pironon S., Vilellas J., Morris W.F., Doak D.F., García M.B. Do geographic, climatic or historical ranges differentiate the performance of central versus peripheral populations? *Glob. Ecol. Biogeogr.* 2015;24(6):611–620.
8. Gale S.W., Fischer G.A., Cribb P.J., Fay M.F. Orchid conservation: bridging the gap between science and practice. *Bot. J. Linn. Soc.* 2018;186(4):425–434.
9. Fay M.F. Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Bot. Stud.* 2018;59(1):16.
10. Efimov P.G. Orchids of Russia: annotated checklist and geographic distribution. *Nat. Conserv. Res.* 2020;5(Suppl.1):1–18.
11. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Тов-во научн. изд. КМК; 2008. 855 с.
12. Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана). М.: Тов-во научн. изд. КМК; 2014. 437 с.
13. Blinova I.V., Uotila P. *Dactylorhiza traunsteineri* (Orchidaceae) in Murmansk Region (Russia). *Memo. Soc. Fauna Flora Fenn.* 2012;88:67–79.
14. Kirillova I.A., Kirillov D.V. Impact of weather conditions on seasonal development, population structure and reproductive success on *Dactylorhiza traunsteineri* (Orchidaceae) in the Komi Republic (Russia). *Nat. Conserv. Res.* 2020;5(Suppl.1):77–89.
15. Sletvold N., Øien D-I., Moen A. Long-term influence of mowing on population dynamics in the rare orchid *Dactylorhiza lapponica*: the importance of recruitment and seed production. *Biol. Conserv.* 2010;143(3):747–755.
16. Sletvold N., Grindeland J.M., Ågren J. Pollinator-mediated selection on floral display, spur length and flowering phenology in the deceptive orchid *Dactylorhiza lapponica*. *New Phytol.* 2010;188(2):385–392.
17. Красная книга Республики Коми. Сыктывкар: Коми респ. типогр., 2019. 766 с.
18. Атлас Республики Коми по климату и гидрологии. М.: Дик, Дрофа; 1997. 116 с.
19. Атлас почв Республики Коми. Под ред. Г.В. Добровольского, А.И. Таскаева и И.В. Забоевой. Сыктывкар: Коми респ. типогр.; 2010. 356 с.
20. Злобин Ю.А., Скляр В.Г., Клименко А.А. Популяции редких видов растений: теоретические основы и методика изучения. Сумы: Унив. книга; 2013. 439 с.
21. Arditti J., Michaud J.D., Healey P.L. Morphometry of orchid seeds. I. Paphiopedilum and native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera*, *Corallorhiza* and *Epipactis*. *Am. J. Bot.* 1979;66(10):1128–1137.
22. Healey P.L., Michaud J.D., Arditti J. Morphometry of Orchid Seeds. III. Native California and Related Species of *Goodyera*, *Piperia*, *Platanthera* and *Spiranthes*. *Am. J. Bot.* 1980;67(4):508–518.
23. Kirillova I.A., Kirillov D.V. Reproduction biology of *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (Orchidaceae) on its northern distribution border. *Contemp Probl Ecol.* 2015;8(4):512–522.
24. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2020. URL <https://www.R-project.org/>.
25. Kawecki T.J. Adaptation to marginal habitats. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2008;39:321–342.
26. Øien D.I., Moen A. Flowering and survival of *Dactylorhiza lapponica* and *Gymnadenia conopsea* in the Sølendet Nature Reserve, Central Norway. *Trends and fluctuations and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations*. Eds. P. Kindlmann, J.H. Willems, and D.F. Whigham. Leiden: Backhuys; 2002. P. 3–22.
27. Hall C.A., Stanford J.A., Hauer F.R. The distribution and abundance of organisms as a consequence of energy balances along multiple environmental gradients. *Oikos*. 1992;65(3):377–390.
28. Kirillova I.A., Kirillov D.V. Seed Productivity of *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (Orchidaceae, Liliopsida) on the northern border of its distribution range. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2021;48(10):1813–1821.
29. Kirillova I.A., Kirillov D.V. Population structure and seed productivity of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae, Liliopsida) at the northern border of its habitat. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2022;49(10):272–292.
30. Kirillova I.A., Kirillov D.V. Reproductive success of *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó at the northern border of its distribution range. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2023;50(1):68–78.
31. Arditti J., Michaud J.D., Healey P.L. Morphometry of orchid seeds. II. Native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera*, *Corallorhiza* and *Epipactis*. *Am. J. Bot.* 1980;67(3):347–360.
32. Kirillova I.A., Kirillov D.V. Reproductive success of marginal populations of *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). *Russ. J. Ecol.* 2022;53(3):152–157.
33. Vilellas J., Ehrlén J., Olesen J.M., Braza R., García M.B. Plant performance in central and northern peripheral populations of the widespread *Plantago coronopus*. *Ecography*. 2013;36(2):136–145.

Поступила в редакцию 07.02.2023

После доработки 04.05.2023

Принята в печать 15.06.2023

## RESEARCH ARTICLE

# Living at the edge: a comparative study of the central and marginal populations of *Dactylorhiza traunsteineri* (Orchidaceae) in European Northeast of Russia

I.A. Kirillova\* , D.V. Kirillov 

*Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences,  
28 Kommunisticheskaya str, Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russia*

\*e-mail: kirillova\_orchid@mail.ru

Peripheral populations are considered more vulnerable than central ones, but recent studies have questioned the existence of clear patterns within species ranges. We studied reproductive and demographic characteristics of the rare orchid *Dactylorhiza traunsteineri* at the northeastern limit of its distribution range (the Subpolar Urals) and compared them with the data of four populations located closer to the center of the range (south of the Komi Republic). In peripheral populations, number of individuals per population, plant sizes, number of flowers per individual and seeds per fruit were significantly lower than those in populations located closer to the center of the area. Contrary to expectations, the peripheral populations were renewed better than the central ones, which may be due to the high level of moisture availability in the Subpolar Urals. The proportion of juvenile individuals in the peripheral populations was 18.7%, in populations in the south of the Komi Republic – 6.3–6.9%. In addition, we found that in the direction from the center to the periphery of the species range, the proportion of empty space in seeds increased (from 63.9 to 75.6%). This provides the seeds with better volatility and increases the chances of reaching places favorable for germination, which are becoming fewer at the edge of the range.

**Keywords:** orchids, range boundary, reproductive success, population structure, Komi Republic, seed morphometry

**Funding:** This study was performed as part of the state assignment of the Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (no. 122040600026-9).

## Сведения об авторах

*Кириллова Ирина Анатольевна* – канд. биол. наук, науч. сотр. отдела флоры и растительности Севера Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Тел.: 8-821-221-68-55; e-mail: kirillova\_orchid@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7774-7709>

*Кириллов Дмитрий Валерьевич* – канд. биол. наук, науч. сотр. отдела флоры и растительности Севера Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Тел.: 8-821-221-68-55; e-mail: kirdimka@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6577-693X>

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 57.021+57.023+57.026

**Влияние пептида Ас-D-MPRG на основе С-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина(6-9) на поведение крыс разного возраста****А.А. Стаханова<sup>1</sup>, \* , О.Г. Воскресенская<sup>1</sup>, В.П. Голубович<sup>2</sup>, А.А. Каменский<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*<sup>2</sup>*Лаборатория прикладной биохимии, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси, 220141, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, д. 5, к. 2*\*e-mail: [anna.stahanova@inbox.ru](mailto:anna.stahanova@inbox.ru)

В данной работе было выявлено, что Ас-D-MPRG – тетрапептид, синтезированный на основе С-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина(6-9) – при хроническом неонатальном введении влияет на тревожность и ориентировочно-исследовательское поведение крыс всех трех изученных возрастных групп. Также было установлено, что пептид оказывает наиболее выраженное действие в стрессогенных условиях. У крыс, получавших пептид во всех трех исследуемых дозах, наблюдали сниженный уровень тревожности, что проявлялось в уменьшении количества актов груминга в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» и увеличении времени нахождения в светлом отсеке в тесте «Светло-темная камера». Двигательная активность изменялась от пассивного затаивания в препубертатном периоде к активному избеганию в пубертатный период и у взрослых животных. На основании полученных данных можно сделать вывод, что пептид проявляет свое действие только при наличии биологически значимых стимулов.

**Ключевые слова:** поведение, тревожность, пептидные препараты, аналог аргинин-вазопрессина, ориентировочно-исследовательская реакция, интраназальное введение

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-1

Фармакологические препараты пептидной природы в последнее время стали привлекать пристальное внимание исследователей в области психофармакологии. С каждым годом растет разнообразие пептидных препаратов, обладающих ноотропным, антидепрессантным и анксиолитическим действием.

Вазопрессин, в дополнение к широко известной гормональной активности, вызывает ряд негормональных эффектов. Помимо действия на периферийные органы, аргинин-вазопрессин (АВП) вызывает целый набор эффектов в центральной нервной системе, воспроизводя процессы обучения и запоминания, а также изменяя ответные реакции на стрессогенные факторы. АВП является одним из регуляторных пептидов, способных модифицировать процесс обучения. Он обладает анксиолитическим и антидепрессантным действием [2].

Ранее было выявлено, что АВП и ряд его структурных аналогов при их хроническом неонатальном введении оказывают антистрессорное действие, способствуют улучшению обучаемости. Данные эффекты не ослабевают со временем, что может доказывать влияние пептидов этого ряда на созревание и формирование разнообразных ней-

роэндокринных систем мозга в постэмбриональном периоде развития животных [3].

В первый раз о ноотропном воздействии АВП и его структурных аналогов было упомянуто в ранних исследованиях группы Де Вида [4, 5]. В них же было представлено доказательство наличия негормональных эффектов АВП. Было показано, что периферическое, а также внутримозговое введение АВП положительно влияет на обучаемость животных и степень их депрессивности.

При поиске минимально возможных фрагментов АВП, вызывающих ноотропный эффект, был синтезирован целый ряд аналогов АВП, в частности – (АВП(6-9)). После этого был проведен ряд исследований по их влиянию на память и обучение животных. В результате были синтезированы пептиды, в состав которых входили с 6-й по 9-ю аминокислоты из АВП: Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (CPRG) и Cys-Pro-Arg (CPR) [6]. Например, пептид CPRG, один из пептидов, синтезированных на основе АВП(6-9), не оказывал воздействия на выработку навыка в тесте «условная реакция активного избегания» (УРАИ) у здоровых крыс, но был эффективен у животных, находящихся под действием галоперидола [6–7].

В лаборатории общей физиологии и регуляторных пептидов на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ исследовалась биологическая активность таких фрагментов АВП, как АВП(4-8), АВП(4-9), АВП(5-9) и АВП(6-9). Было показано, что именно биологическая активность АВП(6-9) является наиболее высокой. Опираясь на полученные данные [8], сотрудники лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси под руководством профессора В.П. Голубовича синтезировали аналог С-концевого фрагмента АВП с заменой Cys в 6-м положении на D-Met – Ас-D-MPRG. Было высказано предположение о том, что данная замена Cys на D-Met способна привести к увеличению устойчивости данного пептида к разрушению пептидазами [7].

### Материалы и методы

Исследования проводились на самцах и самках нелинейных белых крыс, были работоспособны 215 особей. Животные находились в стандартных условиях вивария. Доступ к пище и воде был свободным, также соблюдался 12-часовой световой режим дня (искусственное освещение с 9 до 21 ч). Вся экспериментальная работа на крысах проводилась с 10 до 20 ч. Опыты проводились в рамках биоэтических норм.

В эксперименте использовали аналог С-концевого фрагмента АВП – тетрапептид Ас-D-MPRG, который был синтезирован в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси. Вещество вводили детенышам белых крыс интраназально в дозах 0,01 мг/кг, 1,0 мг/кг и 10 мг/кг в течение 5 сут с 3-х по 7-е сут жизни. В свою очередь контрольным животным вводили соответствующий объем растворителя – дистиллированной воды – в те же сроки введения.

Детеныши белых крыс каждого выводка содержались вместе в отдельной клетке. С матерью крысята находились до месячного возраста. На 45-е сут жизни, когда крысята достигают половозрелости, самцов и самок рассаживали, чтобы избежать близкородственного скрещивания.

Тестирование животных проводилось в трех возрастах: 35–39-е сут жизни (препубертатный период), 49–54-е сут жизни (пубертатный период), 63–69-е сут жизни (взрослые животные).

### Тест «Открытое поле»

**Бесстрессорная модификация.** «Открытое поле» представляет собой стандартную круглую пластиковую арену диаметром 100 см с высокими стенками и полом, расчерченным двумя концентрическими окружностями, расположенными на равном расстоянии друг от друга и от края арены, а также отрезками прямых, делящими поле на 19 равных по площади областей. Тест в данной модификации

проводится под красным светом лампы с мощностью 15 Вт и в тишине [9]. Тестируемых животных помещали в установку на 2 мин и каждые 30 с эксперимента фиксировали параметры: период выхода из центра арены (латентный период); пробег – количество пройденных секторов (горизонтальную двигательную активность); стойки – количество подъемов на задние лапы (вертикальную двигательную активность); количество отходов от стенки арены – выходы I – количество пересечений внешней концентрической окружности; количество выходов в центр арены – выходы II – количество пересечений внутренней концентрической окружности; количество умываний – груминг – количество касаний животным морды передними лапами.

**Стрессогенная модификация.** Красный свет был заменен на ярко-белый мощностью 200 Вт и электрический звонок. Тестирование животных проводилось, как описано выше.

### Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Эксперимент проводили в стандартном лабиринте для взрослых крыс. Установка была разделена на четыре рукава: два – с направленным ярким светом мощностью 200 Вт и без перегородок (открытое пространство) и два – без освещения и стенками (закрытое безопасное пространство.) Тестируемых животных помещали в установку мордой на освещенный рукав, тест проводили в течение 3 мин [8]. В тесте оценивали: латентный период первого захода в темный отсек, с; общее время нахождения на свету, с; количество выходов на первую или вторую половину светлого рукава; количество переходов из одного темного отсека в другой; количество переходов из одного светлого отсека в другой; количество пересечений центра лабиринта – общее количество переходов; количество свешиваний с открытых рукавов лабиринта; количество выглядываний из закрытых рукавов лабиринта; вертикальная двигательная активность – стойки – количество подъемов на задние лапы; количество умываний – груминг – количество касаний морды передними лапами.

### Тест «Светлая – темная камера»

Установка представляет собой камеру (размер 30 × 22 × 35 см), разделенную перегородкой с отверстием на два отсека: один – ярко освещенный, другой – затемненный. Животное помещали в светлый отсек и в течение 3 мин наблюдали перемещение крыс из отсека в отсек. Более подробно методика описана ранее [8]. Параметры, исследуемые в тесте: латентный период перехода в темный отсек, с; суммарное время, проведенное в светлом отсеке, с; количество стоков в светлом и темном отсеках; количество выглядываний из темного отсека; количество переходов между светлым и темным отсеками; количество умываний в светлом и темном отсеках.

### Статистическая обработка результатов

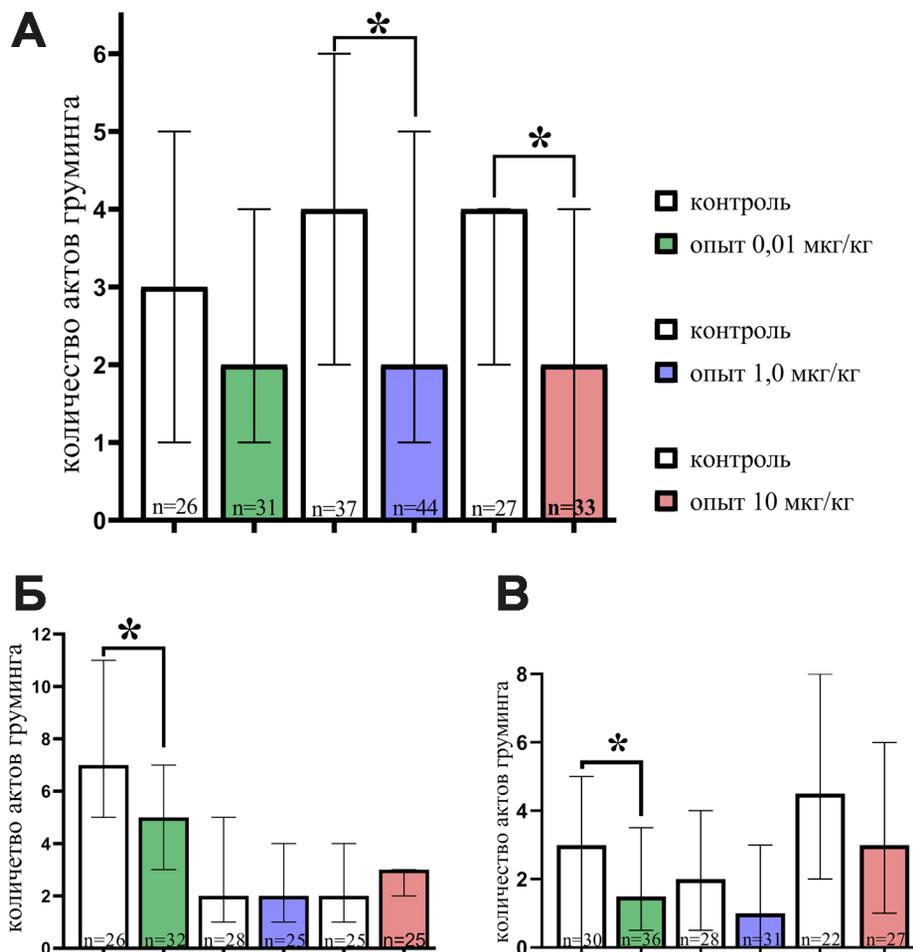
Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием стандартных методов статистического анализа. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения параметров эксперимента массив данных сравнивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Обработку массива данных проводили с помощью статистических программ «GraphPad Prism 8.0» (GraphPad Software, США), «Statistica 10.0», «Microsoft Excel». На графиках данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Значимыми различия считались при вероятности ошибки  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

**Тетрапептид Ас-D-MPRG влияет на уровень тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».** Хроническое неонатальное введение тетрапептида в дозе 0,01 мкг/кг вызывало статистически значимое снижение количества актов

груминга, которое наблюдали в период 49–54 сут жизни (рис. 1Б) и 63–69 сут жизни (рис. 1В) ( $p = 0,0110$  и  $p = 0,0437$  соответственно), а также в этих группах наблюдали значимое увеличение количества свешиваний с открытых рукавов лабиринта у опытной группы по сравнению с контрольной ( $p = 0,0291$  и  $p = 0,0254$  соответственно). В период 35–39 сут жизни введение Ас-D-MPRG в дозах 1,0 и 10 мкг/кг приводило к статистически значимому уменьшению количества актов груминга ( $p = 0,0064$  и  $p = 0,0487$  соответственно) (рис. 1А), что свидетельствует о снижении эмоциональной напряженности животных. Таким образом, неонатальное введение Ас-D-MPRG в дозе 0,01 мкг/кг в период с 49 по 69 сут жизни и в дозах 1,0 и 10 мкг/кг в период с 35 по 39 сут жизни приводит к понижению уровня тревожности и эмоциональной реактивности животных.

**Влияние Ас-D-MPRG на тревожность в тесте «Светло-темная камера».** В тесте «Светло-темная камера» неонатальное введение Ас-D-MPRG в период 35–39 сут жизни во всех трех дозах (0,01, 1,0



**Рис. 1.** Изменение груминга у животных, неонатально получавших Ас-D-MPRG, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха)

Значимые отличия от контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

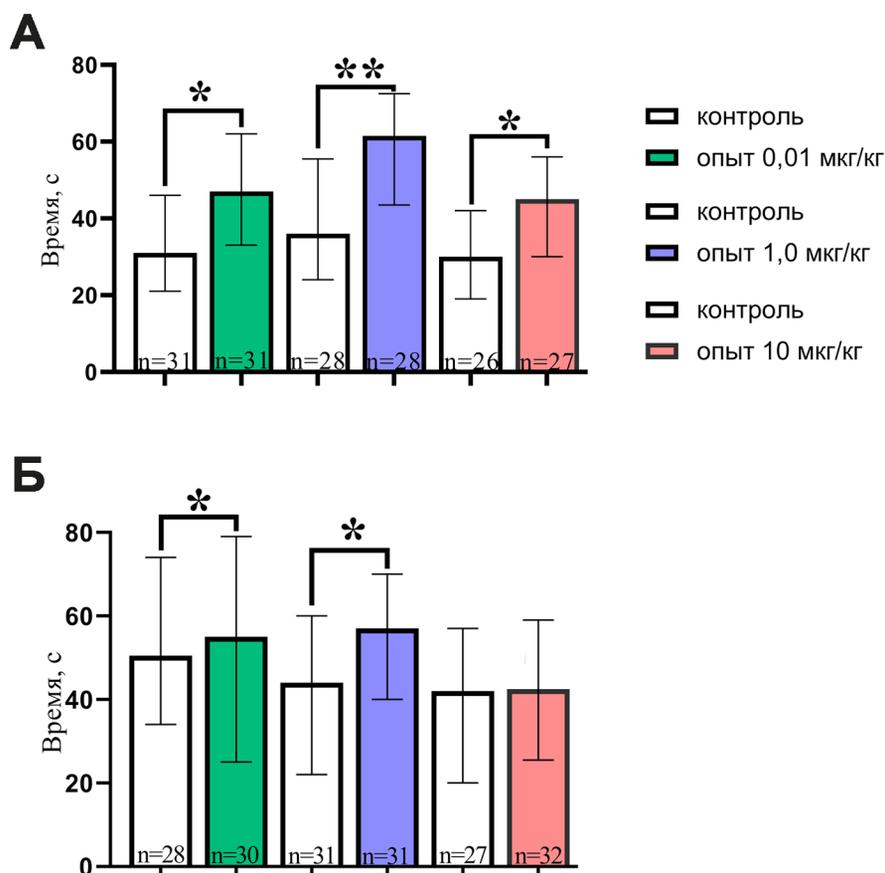
А – 35–39 сут жизни – препубертатный период; Б – 49–54 сут жизни – пубертатный период; В – 63–69 сут жизни – взрослые животные

и 10 мкг/кг) приводило к статистически значимому увеличению времени, проводимого в светлом отсеке камеры, у животных опытной группы по сравнению с контрольной ( $p = 0,0124$ ,  $p = 0,0001$  и  $p = 0,0207$  для доз 0,01, 1,0 и 10 мкг/кг соответственно) (рис. 2А). Животные из опытной группы также значимо больше делали переходов между отсеками камеры ( $p = 0,0251$ ,  $p = 0,0429$  и  $p = 0,0140$  для доз 0,01, 1,0 и 10 мкг/кг соответственно), но значимо реже выглядывали из темного отсека, чем крысы контрольной группы ( $p = 0,0109$  и  $p = 0,007$  для доз 0,01 и 1,0 мкг/кг соответственно). В период 49–54 сут жизни введение тетрапептида приводило к статистически значимому увеличению времени нахождения на свету только при введении в дозе 1,0 мкг/кг ( $p = 0,0251$ ) (рис. 2Б), также уменьшилось количество выглядываний из темного отсека камеры у опытных крысят при введении препарата в дозах 0,01 и 1,0 мкг/кг ( $p = 0,0455$  и  $p = 0,0463$  соответственно). У взрослых животных статистически значимых отличий между группами не выявлено.

Регуляцию уровня тревожности выполняет АВП, синтезируемый в экстрагипоталамической части вазопрессинергической системы [10]. В этой

зоне проекции нейронов следуют в передний мозг к его латеральному септуму, в котором содержится плотная сеть вазопрессин-содержащих нейронов [11]. Для этой области мозга характерна высокая плотность V1a-рецепторов АВП [12]. Локальная экстрагипоталамическая активация рецепторов данного типа участвует в обеспечении влияния АВП на уровень тревожности животных [13]. Мы предполагаем, что для проявления эффекта необходимы более стрессогенные условия. Например, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» условия менее стрессогенные, чем в «светло-темной камере», так как камера меньше по размерам и перепад освещенности двух отсеков камеры ярче выражен. В период неонатального введения Ас-D-MPRG часть вазопрессинергической системы, которая отвечает за эту поведенческую активность, еще не окончательно сформирована, поэтому мы и наблюдали влияние пептида на уровень тревожности животных только в более стрессогенных условиях [14].

*Влияние Ас-D-MPRG на ориентировочно-исследовательское поведение в тесте «открытое поле» (бесстрессорная и стрессогенная модификация).* В тесте «открытое поле» (бесстрессорная модифи-



**Рис. 2.** Изменение двигательной активности у животных, неонатально получавших Ас-D-MPRG, в тесте «светло-темная камера» (данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха)

Значимые отличия от контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

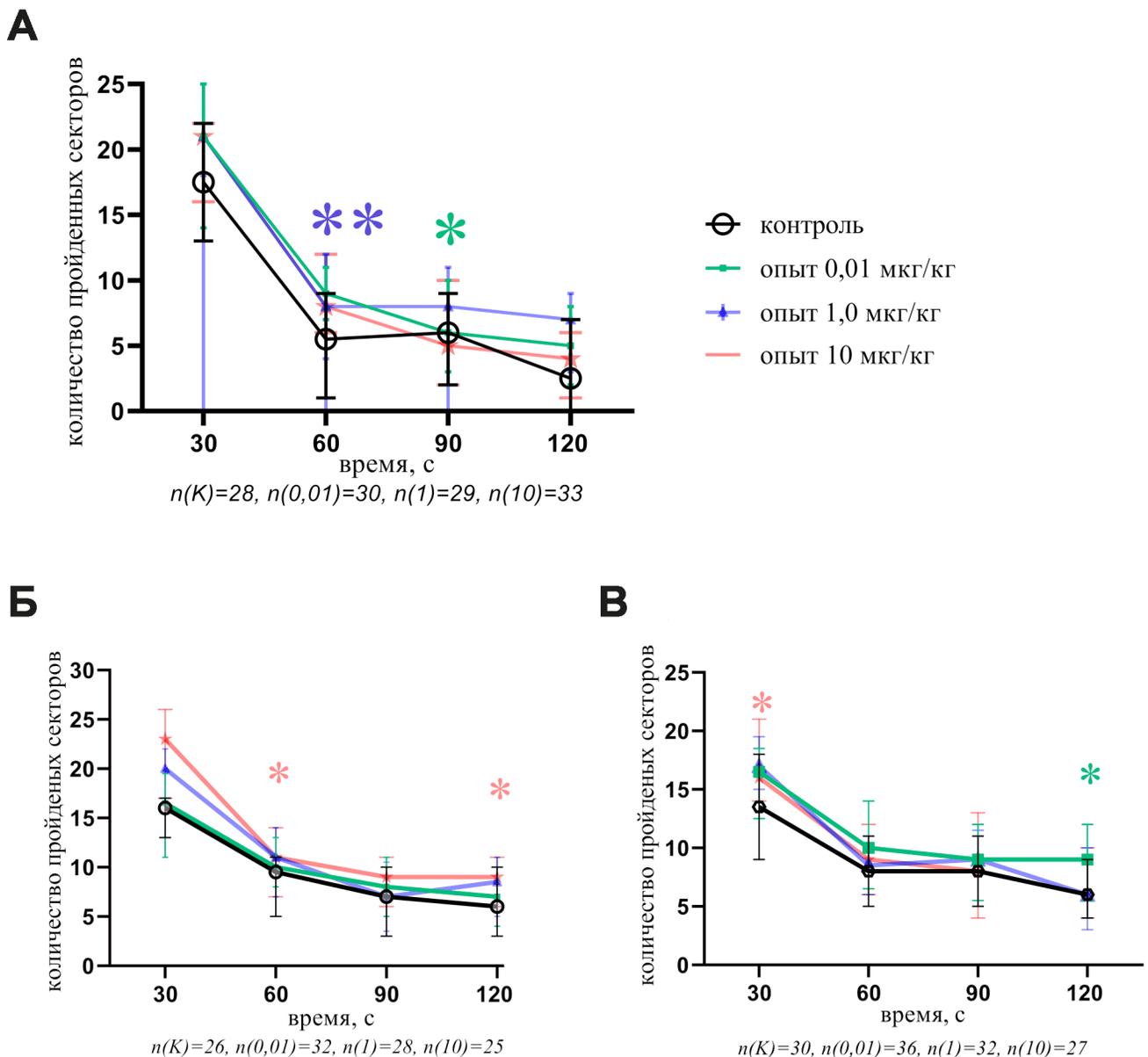
А – 35–39 сут жизни – препубертатный период; Б – 49–54 сут жизни – пубертатный период

кация) не было значимых отличий в поведении крыс контрольной и опытной группы при неонатальном введении Ас-D-MPRG во всех трех дозах и во всех возрастах.

В тесте «открытое поле» (стрессогенная модификация) в период 35–39 сут жизни наиболее эффективной оказалась доза пептида 1,0 мкг/кг: статистически значимо уменьшался пробег у опытных животных в период 30–60 с тестирования ( $p = 0,0105$ ) (рис. 3А), а также суммарный пробег за все время тестирования ( $p = 0,0099$ ). На 49–54 сут жизни статистически значимо увеличивался пробег у опытных животных в период 30–60 с ( $p = 0,0198$ ) и в период 90–120 с ( $p = 0,0269$ ) (рис. 3Б), а также

в период 30–60 с увеличивалось количество стоек ( $p = 0,0056$ ) при использовании тетрапептида в дозе 10 мкг/кг. На 63–69 сут жизни наблюдалось статистически значимое увеличение пробега в период 0–30 с ( $p = 0,0130$ ) и суммарный пробег ( $p = 0,0147$ ) (рис. 3В) при хроническом введении тетрапептида в дозе 1 мкг/кг.

Данные результаты подтверждают то, что в условиях неизбежного стресса у животных, начиная с пубертатного периода, наблюдается усиление ориентировочно-исследовательской реакции. Это может свидетельствовать о преимущественном развитии реакции избегания при действии стрессогенных факторов.



**Рис. 3.** Изменение горизонтальной двигательной активности у животных, неонатально получавших Ас-D-MPRG, в тесте «открытое поле» (стрессогенная модификация) (данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха)

Значимые отличия от контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

А – 35–39 сут жизни – препубертатный период; Б – 49–54 сут жизни – пубертатный период; В – 63–69 сут жизни – взрослые животные

Понятие двигательной активности состоит из достаточно большого числа поведенческих составляющих, определяемых степенью возбуждения моторных центров, а также уровнем исследовательской активности, способностью к созданию новых двигательных программ и др. Уровень горизонтальной двигательной активности хорошо характеризует уровень возбуждения локомоторных центров. Соответствующие исполнительные области располагаются в спинном мозге. Вертикальная же активность рассматривается в рамках ориентировочного поведения, которое направлено на собирание новой информации. При переходе от горизонтальной двигательной активности к вертикальной (выполнение стоек) обеспечиваются торможение локомоторных проявлений, а также смена двигательных программ. Эта задача решается как высшими центрами головного мозга, так и корой больших полушарий, и базальными ганглиями [13].

Таким образом, в результате работы было показано, что синтетический аналог фрагмента АВП(6-9) – Ас-D-MPRG – вызывает отставленные поведенческие эффекты. Тетрапептид ока-

зывает влияние на двигательную активность животных всех возрастов, а также проявляет некоторое анксиолитическое действие. Наиболее эффективными оказались дозы 0,01 и 1,0 мкг/кг. Влияние хронического неонатального введения Ас-D-MPRG наиболее выражено у животных в препубертатный и пубертатный периоды жизни.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (№ 121032300071-8), без поддержки государственных или частных фондов в рамках договора о научно-техническом сотрудничестве между «Институтом биоорганической химии» Национальной академии наук Беларуси и биологическим факультетом Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с целью проведения работ по исследованию пептидных соединений. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены комиссией Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по биоэтике (протокол № 107-д). Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freeman S.M., Bales K.L. Oxytocin, vasopressin, and primate behavior: diversity and insight. *Am. J. Primatol.* 2018;80(10):e.22919.
2. Li C.Y., Zhang L., Li J., Qi C.L., Li D.Y., Liu X., Qu X. Effect of endogenous arginine-vasopressin arising from the paraventricular nucleus on learning and memory functions in vascular dementia model rats. *Biomed. Res. Int.* 2017;2017:3214918.
3. Møller M. Vasopressin and oxytocin beyond the pituitary in the human brain. *Handbook of clinical neurology. The human hypothalamus. Middle and posterior region, vol. 180.* Eds. D.F. Swaab, F. Kreier, P.J. Lucassen, A. Salehi, and R.M. Buijs. Elsevier; 2021: 7–24.
4. de Wied D. Central actions of neurohypophysial hormones. *Prog. Brain Res.* 1983;60:155–167.
5. de Wied D. Long term effect of vasopressin on the maintenance of a conditioned avoidance response in rats. *Nature.* 1971;232(5305):58–60.
6. Бородина К.В., Стаханова А.А., Мартинович В.П., Воскресенская О.Г., Голубович В.П., Каменский А.А. Синтез и исследование влияния аналога аргинин-вазопрессина(6-9) на поведение крыс различных возрастных групп. *Изв. Нац. акад. наук Бел. Сер. хим. наук.* 2021;57(1):61–69.
7. Голубева М.Г., Григорьева М.Е. Влияние нейрогипофизарных гормонов и их модифицированных форм на гемостаз. *Нейрохимия.* 2008;25(1):17–22.
8. Воскресенская О.Г., Каменский А.А., Голубович В.П. Влияние хронического постнатального введения АС-D-MPRG на уровень тревожности белых крыс. *Рос. физиол. журн.* 2004;90(8):170.
9. Ким П.А., Воскресенская О.Г., Мартинович В.П., Голубович В.П., Каменский А.А. Отставленные эффекты неонатального введения аргинин-вазопрессина и его структурного аналога Ас-D-SPRG на поведение белых крыс. *Вопр. биол., мед. фарм. хим.* 2011;(4):17–22.
10. Угрюмов М.В. *Механизмы нейроэндокринной регуляции.* М.: Наука; 1999. 298 с.
11. Walker D.L., Devis M., Young L.J. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J. Neurosci.* 1997;17(23):9375–9383.
12. Наточин Ю.В., Канашкина Т.А., Мордвинцев Д., Шахматова Е.И. Рецепторы вазопрессина: структура и стимуляция 1-дезамино-аргинин-вазотонином у крыс. *Рос. физиол. журн.* 2007;93(6):624–635.
13. Lago T.R., Brownstein M. J., Page E., Beydler E., Manbeck A., Beale A., Roberts C., Balderston N., Damiano E., Pineles S.L., Simon N., Emst M., Grillon C. The novel vasopressin receptor (V1aR) antagonist SRX246 reduces anxiety in an experimental model in humans: a randomized proof-of-concept study. *Psychopharmacology.* 2021;238(9):2393–2403.
14. Freeman S.M., Bales K.L. Oxytocin, vasopressin, and primate behavior: diversity and insight. *Am. J. Primatol.* 2018;80(10):e22919.

Поступила в редакцию 25.10.2022

После доработки 10.03.2023

Принята в печать 29.03.2023

## SHORT COMMUNICATION

**The effect of the Ac-D-MPRG peptide based on the C-terminal fragment of arginine-vasopressin(6-9) on the character of rats of different ages**А.А. Stakhanova<sup>1</sup>, \* , О.Г. Voskresenskaya<sup>1</sup>, , <sup>1</sup><sup>1</sup>*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;*<sup>2</sup>*Applied Biochemistry Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Science of Belarus, 5/2 Acad. V.F. Kuprevich str., Minsk, 220141, Belarus*\*e-mail: [anna.stahanova@inbox.ru](mailto:anna.stahanova@inbox.ru)

In this work, it was found that Ac-D-MPRG, a tetrapeptide synthesized on the basis of the C-terminal fragment of arginine-vasopressin(6-9), upon chronic neonatal administration, affects anxiety and exploratory behavior in rats of three age groups. The most significant effect of the peptide was manifested under more stressful conditions. The rats of the experimental group showed less anxiety. They did less grooming in the Elevated Plus Maze test and increased time in light in the Light-Dark Chamber test. Motor activity changed from passive holding in the prepubertal period to active avoidance in puberty and adulthood. Based on the data obtained, we conclude that the effects of the peptide are manifested only when exposed to a biologically significant stimulus.

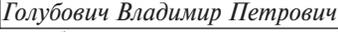
**Keywords:** *behavior, anxiety, peptide drugs, arginine-vasopressin analog, orienting-exploratory reaction, intranasal administration*

**Funding:** The work was carried out within the framework of the state task of Lomonosov Moscow State University (No. 121032300071-8), without the support of public or private funds under the agreement on scientific and technical cooperation between the “Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus” and the Biology Faculty.

**Сведения об авторах**

*Стаханова Анна Андреевна* – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-95; e-mail: [anna.stahanova@inbox.ru](mailto:anna.stahanova@inbox.ru); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2086-3746>

*Воскресенская Ольга Георгиевна* – канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-95; e-mail: [voskresenskaya05@mail.ru](mailto:voskresenskaya05@mail.ru)

 – докт. биол. наук, зав. лаб. прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси.

 – докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ.

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

**Изучение спектра активности новых штаммов микромицетов рода *Aspergillus* в отношении белков системы гемостаза**

**А.А. Осмоловский<sup>1</sup>, \* , А.А. Шестакова<sup>1</sup>, Д.Е. Суркова<sup>1, 2</sup>, Р. Лехотска<sup>3</sup>, Е. Пецкова<sup>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>Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, Россия, 101100, г. Москва, ул. Мясницкая д. 20;

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Slovak Medical University in Bratislava, 12 Limbova st., Bratislava, 83303, Slovakia

\*e-mail: aosmol@mail.ru\_

Изучен спектр активности внеклеточных протеаз в отношении белков системы гемостаза для пяти видов микромицетов рода *Aspergillus*. Показано отсутствие типов активности, подобных компонентам системы гемостаза – тромбину, плазмину, фактору Ха, урокиназе и протеину С – а также активаторной активности по отношению к предшественникам человеческих гемостатических протеаз для *A. thecicus*, *A. caespitosus*, *A. glaucus*, *A. tamaritii* и *A. wentii*. Для *A. glaucus* показано наличие протеаз, высокоактивных (58,52 Е<sub>тир</sub>) и высоко-специфичных в отношении фибриногена, а для *A. thecicus*, *A. caespitosus* и *A. wentii* – способность синтезировать протеазы, активные в кислых областях рН.

**Ключевые слова:** протеазы микромицетов, фибринолитические ферменты, тромболитические средства, активаторы белков гемостаза, хромогенные пептидные субстраты, аспергиллы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-7

Микромицеты рода *Aspergillus* известны как продуценты протеаз, активных в отношении разнообразных субстратов. Хорошо изучены фибринолитические протеазы, синтезируемые *A. oryzae*, *A. terricola*, *A. kanagawaensis*, *A. ustus* и многими другими видами [1–5] и перспективные как тромболитические препараты экстренного действия. Кроме того, для некоторых протеаз показана активаторная активность по отношению к белкам системы гемостаза, опосредующая не прямой фибринолиз: протеаза *A. ochraceus* способна активировать протеин С, протеаза *A. terreus* – прекалликреин [6, 7]. Такие ферменты, несмотря на то что выявляются у продуцентов довольно редко [8], признаются перспективными агентами для диагностикомов, используемых при выявлении заболеваний системы гемостаза ввиду уникальности их протеолитического действия. Низкая стоимость культивирования, простота выделения и очистки, а также ограниченная субстратная специфичность секретируемых протеаз делают микромицеты рода *Aspergillus* перспективными продуцентами таких ферментов для биомедицины и фармацевтической промышленности.

В данной работе была исследована способность пяти представителей рода *Aspergillus* секретировать протеолитические ферменты с активностью в отношении белков системы гемостаза. Для данных видов изучение протеолитической активности проводилось впервые.

**Материалы и методы**

**Объекты исследования.** Объектами исследования были штаммы микромицетов *A. thecicus*, *A. caespitosus*, *A. glaucus*, *A. tamaritii* и *A. wentii* из коллекции медицинского факультета Словацкого медицинского университета в г. Братислава. Поддержание штаммов осуществляли в пробирках на скошенном сусло-агаре. В качестве посевного материала использовали культуры, выращенные в течение 7 сут.

**Глубинное культивирование микромицетов.** Культивирование микромицетов проводили в глубоких условиях в шейкере-инкубаторе ES-20/80 (BioSan, Латвия) при 200 об./мин в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C в течение 48 ч на среде, содержащей сусло, глюкозу и пептон [9]. Далее 3% (об./об.) посевного материала переносили в среду № 1 (в %: глюкоза – 3,0, глицерин – 7,0, гидролизат рыбной муки – 0,5, NaNO<sub>3</sub> – 0,2, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,05, MgSO<sub>4</sub> – 0,05, рН 6,0) и среду № 2 (в %: крахмал – 1,0, глюкоза – 3,5, гидролизат рыбной муки – 0,5, пептон – 0,5, MgSO<sub>4</sub> – 0,05, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,05, NaCl – 0,2, рН 6,0) и культивировали в течение 4 сут. После культивирования культуральную жидкость отделяли от мицелия фильтрованием и использовали для определения протеолитической активности.

**Определение протеолитической активности с белковыми субстратами.** Активность внеклеточ-

ных протеаз определяли с различными белковыми субстратами. Для определения общей протеолитической активности использовали 0,2%-й раствор азоказеина (Merck, Германия), приготовленный на 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 8,2) и на 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,5). Для определения фибринолитической активности использовали 1%-й раствор фибриногена (Merck, Германия), приготовленный на 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Для определения гемоглинолитической активности использовали 1%-ю суспензию гемоглобина (Merck, Германия), приготовленную на 0,1 М ацетатном буфере (рН 4,7). Для определения протеолитической активности по отношению к кислым фибриллярным белкам использовали 0,2%-ю суспензию голубого фибрина (Calbiochem, Германия), приготовленную на 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,5). Реакции проводили при постоянном перемешивании (600 об./мин) при 37°C в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия). Для проведения реакции к 200 мкл субстрата добавляли 100 мкл культуральной жидкости. Для остановки реакции после 10 мин (для гемоглобина и фибриногена) или 30 мин (для азоказеина и голубого фибрина) инкубации добавляли 300 мкл 10%-й трихлоруксусной кислоты. Далее образцы центрифугировали в течение 10 мин при 14300 об./мин и в надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность на спектрофотометре BioSpectrometer (Eppendorf, Германия). За единицу гемоглино- и фибринолитической активности ( $E_{тип}$ ) принимали количество фермента, высвобождавшее 1 мкг тирозина за 1 мин в условиях проведения реакции.

За единицы общей протеолитической ( $E_{азк}$ ) и фибринолитической ( $E_{рф}$ ) активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед. в условиях проведения реакции.

Плазминоподобную и активаторную по отношению к плазминогену активность определяли по методу Аструпа—Мюллертца—Лансена с использованием фибриновых пластин [10]. Для приготовления пластины с фибрином 9 мл 0,47%-го раствора бычьего фибриногена (Merck, Германия) и 0,2 мл 0,4%-го раствора тромбина (приготовленных на 0,9%-м NaCl) смешивали и помещали в стеклянную чашку Петри для полимеризации. После часовой стабилизации одну пластину прогревали в течение 30 мин при 86°C для инактивации примеси плазминогена. Фибриновые пластины с нанесенными образцами (30 мкл) инкубировали при 37°C в течение 3 ч в термостате-инкубаторе Binder (Binder, Германия). После инкубации измеряли диаметры зон гидролиза на прогретых и непрогретых чашках. Для расчета активаторной по отношению к плазминогену активности диаметр зоны гидролиза на прогретой чашке вычитали из диаметра на непрогретой. За

единицу активности принимали количество фермента, формирующее зону гидролиза с площадью поверхности 1 мм<sup>2</sup>.

**Определение протеолитической активности с хромогенными пептидными субстратами.** Активность внеклеточных протеаз микромицетов по отношению к белкам плазмы крови человека определяли в реакциях с хромогенными пептидными субстратами: Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym<sup>TH</sup>) и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238) – субстраты тромбина; H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251) – субстрат плазмина; Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765) и Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) – субстраты Ха-фактора плазмы крови человека; Glp-Gly-Arg-pNA (S-2444) – субстрат урокиназы; Glp-Pro-Arg-pNA (S-2366) – субстрат протеина С. Реакции проводили при постоянном перемешивании (600 об./мин) при 37°C в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия).

Для проведения реакции 200 мкл пробы добавляли к 50 мкл 0,05 М Трис-НСl (рН 8,2) и 100 мкл 0,05%-го субстрата, приготовленного на том же буфере, через 5 мин инкубации реакцию останавливали 200 мкл 50%-й уксусной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм.

Активаторные активности по отношению к белкам плазмы крови человека определяли для образцов с низкой прямой активностью по описанному ранее методу [11]. За единицу активности ( $E_{рНА}$ ) в обоих случаях принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от хромогенного субстрата за 1 мин.

### Результаты и их обсуждение

Протеолитическая активность использованных в работе штаммов микромицетов, определенная с белковыми субстратами, представлена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, протеолитическую активность проявляли все штаммы аспергиллов, но наименьшие значения были установлены для микромицета *A. glaucus*, у которого единственная существенная активность наблюдалась в отношении фибриногена и достигала 58,52  $E_{тип}$  при культивировании на ферментационной среде № 1, что может свидетельствовать об узкой субстратной специфичности выделяемых этим продуцентом ферментов. Высокую фибринолитическую активность также показал *A. thecicus* (105,46  $E_{тип}$ ) при культивировании на среде № 2, что в сочетании с низкой общей протеолитической активностью (18,95  $E_{азк}$ ) также может указывать на узкую субстратную специфичность протеаз этого продуцента. *A. thecicus*, кроме того, оказался способен секретировать протеазы, активные в кислой области рН и специфично расщепляющие глобулярные, но не фибриллярные белки. Наибольшую гемоглинолитическую активность показали

*A. caespitosus* и *A. wentii* (292,60 и 127,14 E<sub>тир</sub> соответственно), что уменьшает вероятность применения выделяемых ими ферментов в биомедицине и фармацевтике, но может быть использовано в промышленности. Фибринолитическая активность, определенная с голубым фибрином при pH 5,5, для всех штаммов не превосходила 10,1 E<sub>тф</sub>, что говорит о неспособности исследуемых микромицетов образовывать протеазы, активные в отношении фибриллярных белков в кислых областях pH. Общая протеолитическая активность, определенная с азоказеином при pH 8,2, была достаточно низкой (менее 29 E<sub>азк</sub>) для всех штаммов, кроме *A. wentii* (47,55 E<sub>азк</sub>).

Изучение спектра протеолитической активности выделяемых используемыми микромицетами

ферментов проводили с использованием хромогенных пептидных субстратов, расщепляемых белками системы гемостаза (тромбином, плазмином, фактором Ха, урокиназой и протеином С). Результаты представлены в табл. 2.

Исходя из значений, представленных в табл. 2, можно полагать, что микромицеты, использованные в исследовании, не обладают высокими активностями, подобным тем, что проявляются белками системы гемостаза. Незначительную плазминоподобную активность проявляли *A. glaucus* и *A. tamarii*, однако она не превышала 16 E<sub>рНА</sub>.

Результаты изучения способности внеклеточных протеаз исследуемых микромицетов активировать белки системы гемостаза представлены в табл. 3.

Таблица 1

Протеолитическая активность микромицетов, определенная с белковыми субстратами

Микромицет	Среда	Протеолитическая активность				
		Общая протеолитическая активность (pH 5,5), E <sub>азк</sub>	Общая протеолитическая активность (pH 8,2), E <sub>азк</sub>	Фибринолитическая активность, E <sub>тир</sub>	Гемоглоблинитическая активность, E <sub>тир</sub>	Фибринолитическая активность (pH 5,5), E <sub>тф</sub>
<i>A. athecicus</i>	1	27,60	14,50	0,00	29,89	0,00
	2	72,05	18,95	105,46	22,95	0,00
<i>A. caespitosus</i>	1	2,55	28,35	0,00	84,20	0,00
	2	12,15	10,75	32,63	292,60	0,00
<i>A. glaucus</i>	1	0,00	0,00	58,52	0,00	3,00
	2	0,00	0,00	17,26	9,47	1,25
<i>A. tamarii</i>	1	6,25	6,30	0,00	15,99	0,00
	2	20,90	27,05	4,21	13,68	10,10
<i>A. wentii</i>	1	33,40	47,55	0,00	127,14	6,00
	2	18,95	6,15	17,89	26,10	0,00

Таблица 2

Прямая активность протеаз микромицетов в отношении хромогенных пептидных субстратов белков системы гемостаза

Микромицет	Среда	Активность, E <sub>рНА</sub>						
		Chromozym <sup>TM</sup>	S-2238	S-2251	S-2765	S-2222	S-2444	S-2366
<i>A. athecicus</i>	1	0,00	1,42±1,42	0,09±0,09	0,55±0,55	5,77±2,70	0,00	0,00
	2	2,58±0,32	0,96±0,15	2,93±0,03	1,07±0,44	0,00	0,93±0,06	2,78±0,32
<i>A. caespitosus</i>	1	0,03±0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22±0,12
	2	2,12±0,44	0,09±0,09	0,17±0,03	0,93±0,06	0,00	0,00	1,25±0,09
<i>A. glaucus</i>	1	0,41±0,00	0,00	9,89±1,54	0,00	0,00	5,89±0,03	7,92±0,84
	2	7,19±1,86	6,50±1,39	15,60±1,33	7,48±0,17	0,75±0,32	8,50±0,55	8,70±0,15
<i>A. tamarii</i>	1	1,28±0,06	1,04±1,04	2,29±0,44	2,06±0,09	3,68±0,20	2,12±0,61	0,15±0,05
	2	5,42±0,20	3,54±0,46	10,41±3,86	2,35±0,26	0,00	0,70±0,12	0,00
<i>A. wentii</i>	1	6,06±0,61	0,00	0,75±0,29	0,55±0,32	0,26±0,03	0,78±0,20	0,00
	2	0,29±0,29	0,00	1,89±0,15	2,03±0,46	0,00	1,89±0,09	0,00

Данные табл. 3 свидетельствуют о том, что внеклеточные протеазы, выделяемые всеми используемыми в исследовании штаммами микромицетов рода *Aspergillus*, не обладают достаточными активаторными активностями по отношению к белкам системы гемостаза. Из пяти штаммов, исследованных на предмет проявления активаторной активности в отношении семи субстратов, только *A. athecicus* и *A. wentii* показали активность, превосходящую 10 ед. (14,97 и 10,20 E<sub>pNA</sub> соответственно). Однако такие величины активности не позволяют считать данных микромицетов биотехнологически перспективными.

Для изучения прямой фибринолитической и активаторной по отношению к плазминогену активности был использован метод Аструпа–Мюллертца–Лансена с использованием фибриновых пластин. Результаты представлены в табл. 4.

Наибольшую прямую фибринолитическую активность продемонстрировал *A. athecicus* при культивировании на ферментационной среде № 2 (402,93 Е). В то же время, при культивировании на этой же среде активаторная по отношению к плазминогену активность также была наивысшей среди наблюдаемых, что делает протеазы этого микромицета перспективными в качестве препарата для неотложной медицины, однако

потенциально ограничивает их использование для создания диагностикомов. Также выраженная фибринолитическая активность была показана для *A. caespitosus*, а активаторная по отношению к плазминогену – для *A. wentii*. Отсутствие фибринолитической и незначительная активаторная по отношению к плазминогену активность наблюдались для *A. glaucus*, что в сочетании с низкой протеолитической активностью, определенной с белковыми и хромогенными субстратами, доказывает, что использование данного микромицета как продуцента протеолитических ферментов нецелесообразно.

Полученные результаты могут быть объяснены происхождением использованных микромицетов: они были выделены из различных материалов, включая мышцы, кости, кожу и погребальную одежду из мумифицированных человеческих останков из склепа [12]. Поскольку склеп, в котором они были обнаружены, долгое время не вскрывался, метаболическая активность грибов в условиях ограниченного количества питательного субстрата должна быть крайне низкой. Два основных питательных субстрата, обнаруженные в склепе, представляют собой тела умерших и их одежду, то есть богатые белком и целлюлозой материалы. Вполне возможно, что низкая протеолитическая

Таблица 3

## Активаторная активность протеаз микромицетов в реакциях с хромогенными пептидными субстратами белков системы гемостаза

Микромицет	Среда	Активность, E <sub>pNA</sub>						
		Chromozym <sup>TM</sup>	S-2238	S-2251	S-2765	S-2222	S-2444	S-2366
<i>A. athecicus</i>	1	0,00	0,64±0,36	0,00	0,00	0,00	2,78±0,18	0,00
	2	14,97±0,99	4,35±1,48	0,00	3,07±0,32	0,00	2,38±0,28	0,00
<i>A. caespitosus</i>	1	6,56±0,97	0,00	1,94±0,04	0,93	0,00	0,00	3,28±0,41
	2	0,00	0,00	0,00	1,33	0,00	1,54±0,08	0,00
<i>A. glaucus</i>	1	2,64±0,15	0,00	0,00	0,00	1,13±0,11	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. tamarii</i>	1	0,00	0,52±0,08	1,45±0,09	0,00	0,00	4,29±1,00	2,78±2,78
	2	0,00	0,75±0,21	0,00	4,06±1,08	0,00	0,81±0,07	1,91±1,91
<i>A. wentii</i>	1	0,00	1,91±0,32	0,00	0,00	3,25±0,23	0,70±0,03	0,06±0,06
	2	10,20±0,43	0,41±0,12	0,75±0,20	0,00	0,00	3,60±0,021	0,00

Таблица 4

## Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность протеаз аспергиллов

Микромицет	Фибринолитическая активность, усл.ед/мл		Активаторная к плазминогену активность, усл.ед/мл	
	Среда 1	Среда 2	Среда 1	Среда 2
<i>A. athecicus</i>	174,83±16,48	402,93±0,00	37,46±17,66	310,52±8,24
<i>A. caespitosus</i>	241,43±40,03	141,53±30,61	44,12±17,66	0,00
<i>A. glaucus</i>	0,00	0,00	0,00	14,15±20,01
<i>A. tamarii</i>	0,00	83,25±0,00	104,90±7,06	213,12±0,00
<i>A. wentii</i>	0,00	83,25±0,00	53,28±0,00	91,58±11,77

активность использованных штаммов объясняется метаболической спецификацией в отношении материалов одежды, а не мертвых тканей.

Таким образом, изучена активность внеклеточных протеаз для пяти видов микромицетов рода *Aspergillus*. Показано отсутствие активностей, подобных активности тромбина, плазмина, фактора Ха, урокиназы и протеина С, а также активаторных активностей в отношении этих белков. Продемонстрированы высокая и специфическая

фибринолитическая, фибринолитическая, а также активаторная по отношению к плазминогену активность для *A. thecicus*, а также высокая фибринолитическая активность для *A. caespitosus*.

Работа проведена без привлечения финансирования. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shirasaka N., Naitou M., Okamura K., Fukuta Y., Terashita T., Kusuda M. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience*. 2012;53(5):354–364.
2. Zaikina N.A., Shataeva L.K., Elinov N.P., Samsonov G.V. Some properties of the protease from *Aspergillus terricola*. *Mycopathologia*. 1975;56(3):153–157.
3. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016;71(1):62–66.
4. Kotb E.H., Gamal E.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735. *Biologia*. 2015;70(12):1565–1574.
5. Yadav S., Siddalingeshwara K. Screening and biosynthesis of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus japonicum*. *J. Drug Deliv. Ther.* 2015;5(6):60–62.
6. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes-producers of extracellular proteinases-protein C activators of blood plasma. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012;48(5):488–492.
7. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus*. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015;41(5):500–505.
8. Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Ability of extracellular proteinases of micromycetes *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus sydowii* to affect proteins of the human haemostatic system. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017;72(1):20–24.
9. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S. Production of extracellular proteinases (protein C activators in blood plasma) by the micromycete *Aspergillus ochraceus* during submerged and solid-state cultivation. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013;49(6):580–586.
10. Astrup R., Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1952;40(2):346–351.
11. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013;45(5):488–492.
12. Šimonovičová A., Kraková L., Pangallo D., Majorošová M., Piecková E., Bodoriková S., Dörnhöferová M. Fungi on mummified human remains and in the indoor air in the Kuffner family crypt in Sládkovičovo (Slovakia). *Int. Biodeter. Biodegradat.* 2015;99:157–164.

Поступила в редакцию 27.03.2023

После доработки 18.05.2023

Принята в печать 29.05.2023

## SHORT COMMUNICATION

### Investigation of new *Aspergillus* strains as producers of hemostatically active proteases

A.A. Osmolovskiy<sup>1,\*</sup> , A.A. Shestakova<sup>1</sup>, D.Ye. Surkova<sup>1, 2</sup>, R. Lehotská<sup>3</sup>, E. Piecková<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Faculty of Biology and Biotechnology, Higher School of Economics University, 20 Myasnitskaya str., Moscow, 101100, Russia;

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Slovak Medical University in Bratislava, 12 Limbova str., Bratislava, 83303, Slovakia

\*e-mail: aosmol@mail.ru

For five species of *Aspergillus* micromycetes, the diversity of proteolytic activities against human hemostasis proteins was assessed. For every strain, absence of activities similar to hemostatic proteases – thrombin, plasmin, factor Xa, urokinase, and protein C was shown. In addition, no

activating activities towards precursors of the named proteases were demonstrated. For *A. glaucus*, proteases of high activity (58,52 U<sub>тыр</sub>) and specificity against fibrinogen were found. *A. thecicus*, *A. caespitosus* и *A. wentii*, were capable of proteolysis at acidic pH.

**Keywords:** *proteases of micromycetes, fibrinolytic enzymes, thrombolytics, activators of human hemostatic proteins, chromogenic peptide substrates, Aspergillus*

**Funding:** The study was performed without financial support.

#### Сведения об авторах

*Осмоловский Александр Андреевич* – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

*Шестакова Анна Александровна* – аппаратчик синтеза кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: anashestakova2001@gmail.com

*Суркова Дарья Евгеньевна* – аппаратчик синтеза кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: surkovadaria2002@gmail.com

*Рената Лехотска* – сотр. департамента общественного здоровья Словацкого медицинского университета в Братиславе. Тел.: +421 2/593 701 11; e-mail: elena.pieckova@szu.sk

*Елена Пецкова* – Ph.D., доц. департамента общественного здоровья Словацкого медицинского университета в Братиславе. Тел.: +421 2/593 701 11; e-mail: elena.pieckova@szu.sk

## МНЕНИЕ

УДК 378:576.35:57.017.6

**Основы биологии старения для небиологов МГУ****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*

Кратко излагается история создания курса лекций «Основы биологии старения» на биологическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а также в Центре инженерно-медицинских и биологических наук Харбинского политехнического университета. В процессе чтения этого курса у автора сложилось впечатление, что основные его положения могут быть интересными и для студентов небиологических специальностей, которые в последнее время довольно часто подключаются к работе по реализации геронтологических грантов. Во многом это определяется, по-видимому, значительно возросшим за последние годы финансированием такого рода исследований. В свою очередь, это является следствием того, что средняя продолжительность жизни людей в развитых странах резко возросла за последние десятилетия. Однако максимальная продолжительность жизни практически не изменилась (она сейчас такая же, как и тысячелетия назад, просто шансов дожить до возраста долгожителя стало гораздо больше). Если раньше часто умирали в раннем возрасте от различных не связанных с возрастом болезней (главным образом – инфекционных), то сейчас, вследствие значительных успехов медицины, большинство людей доживают до старости. В результате смерть «от старения» становится все более распространенной. В то же время многие весьма смутно представляют себе, что такое старение, каковы его механизмы и как можно с ним бороться. В связи с этим в 2022 г. в МГУ был организован межфакультетский курс лекций по выбору для студентов любых подразделений университета, кроме самого биологического факультета. Он называется «Основы биологии старения, или все, что вы хотели знать о старении (но боялись спросить)». Материал лекций был специально адаптирован для студентов, не являющихся по основной специальности биологами. Основной акцент в курсе, состоящем из 12 лекций, сделан на фундаментальных определениях и методических/методологических подходах, используемых в геронтологии. В статье перечислены вопросы, вынесенные на зачет, и кратко анализируются его результаты.

**Ключевые слова:** старение, геронтология, курс лекций, преподавание, студенты небиологических специальностей, Московский университет

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-5

Впервые курс лекций «Основы биологии старения» был организован мной в 1999 г. для студентов кафедры эмбриологии биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова [1, 2]. Предполагалось, что тем, кто изучает онтогенез, имеет смысл разбираться и в его последних стадиях. В рамках курса рассматривались самые различные вопросы теоретической и экспериментальной геронтологии, в частности:

- Геронтология, ее роль в биологии и медицине, история становления и развития как науки. Современное состояние геронтологических исследований в России и за рубежом.

- Определения понятий – старение, смертность, продолжительность жизни (средняя, максимальная, средняя ожидаемая, видовая).

- Теория надежности и старение. Скорость старения – что это такое? Есть ли разница между старением автомобилей и людей?

- Кривые выживания, таблицы смертности. Уравнение Гомпертца-Мейкхема. Стареющие и нестареющие виды. Чем определяются видовые различия в продолжительности жизни и скорости старения? Как пресноводная гидра ускользнула от старения и стала бессмертной?

- Ускоренное и преждевременное старение. Прогероидные синдромы.

- Продольные (лонгитудинальные) и поперечные геронтологические исследования. Их плюсы и минусы. Почему первые лучше вторых?

- Половые различия в продолжительности жизни. Почему женщины живут дольше мужчин?

- Эволюция и старение. Старение простейших, бактерий, грибов, микоплазм, растений и др.

- Различные концепции старения (свободно-радикальная теория, теория «катастрофы ошибок», «холестериновая» концепция, концепция ограничения пролиферации как причины накопления повреждений макромолекул при старении и др.).

- Запрограммировано ли старение? Как работает несуществующая программа старения? О связи развития и старения.

- Методология геронтологических исследований. Требования к новым теориям старения.

- Биологический возраст – определение, методы оценки, использование в геронтологических и гериатрических исследованиях. Требования к маркерам биологического возраста. Что означает фраза «ему 50, а выглядит он на 30»?

- Физиология, молекулярная биология, биохимия старения (основы). Генетика и старение.

- Долголетие и долгожители. «Возрастные» болезни. Старение – норма или патология? Гериатрия и биология старения. Социально-психологические аспекты геронтологии.

- Возможная роль в старении изменений ДНК, белков, липидов, структуры и функции мембран. Репарация ДНК и старение. Холестерин и старение. Можно ли каждый день есть яйца?

- Возрастные изменения различных физиологических систем – кровь, сердечно-сосудистая система, дыхательная система, пищеварительная система, мочевыделительная система, нейрогуморальная система, иммунная система (основы).

- Половые клетки и старение. Проблема «бессмертия» зародышевой линии. «Эффект возраста матери». Стволовые клетки и старение. Почему дети рождаются молодыми от взрослых родителей?

- Классификация модельных объектов, используемых для исследования процессов старения и тестирования потенциальных геропротекторов и геропромоторов. Различные подходы к их выбору.

- Экспериментальное продление жизни. Геропротекторы (замедляющие старение факторы), подходы к их тестированию. Ограничение питания. Физическая активность. Секс и старение. Антиоксиданты. Латирогены. Комплексоны. Можно ли считать геропротекторами воду и антибиотики? Насколько полезно в геронтологическом плане ограничение питания?

- Геропротекторы («ускорители» старения). Переедание. Ионизирующая радиация. Различные загрязнители окружающей среды. Индуцированное радиацией преждевременное старение.

- Аутофагия, ее активаторы/ингибиторы и старение.

- Старение клеток *in vitro* («феномен Хейфлика») – история вопроса, использование клеточных культур в экспериментальной геронтологии. Цитогеронтология. Теория маргинотомии. Теломеры и теломераза. Теория коммитирования. Модели «стационарного» и хронологического старения. Другие геронтологические модели, использующие культивируемые клетки (например, «клеточно-кинетическая модель» для испытания геропротекторов и геропротекторов). Дискуссии о термине «клеточное старение» (cell senescence). Феномен DDR (DNA Damage Response). «Бессмертные» линии трансформированных и иммортализованных клеток.

- Сенолитики, сеностатики, сеноморфики. Зачем они нужны?

- «Сущностные» и «коррелятивные» модели в геронтологических исследованиях.

- Возможные последствия увеличения продолжительности жизни для человечества.

На основании этого курса в 2008 г. мной был создан курс лекций на английском языке для магистрантов Центра инженерно-медицинских и биологических наук Харбинского политехнического университета (Department of Life Science and Engineering of Harbin Institute of Technology) в Китае [3, 4]. Курс вызвал большой интерес китайских коллег и даже получил премию на конкурсе зарубежных лекций в этом университете. В 2009 г. я снова читал этот курс в Харбине, причем на этот раз все слушатели сдали лектору зачет, прошедший весьма успешно. С 2010 г. в силу определенных обстоятельств я не смог ездить в Китай, так что китайские коллеги продолжили читать его сами, ориентируясь на мои разработки.

В процессе чтения обоих курсов у меня сложилось четкое представление о том, что адекватное восприятие студентами и аспирантами результатов современных молекулярно-геронтологических исследований невозможно без понимания основных фундаментальных определений и понятий, используемых как в теоретической, так и в экспериментальной геронтологии. В дальнейшем на многочисленных геронтологических конференциях я неоднократно говорил, что, по-видимому, нельзя изучать тонкие механизмы старения и долголетия на клеточном и молекулярном уровне (а именно на этом сосредоточены в настоящее время усилия большинства геронтологов), не имея представления о том, что такое старение, биологический возраст, ожидаемая продолжительность жизни, клеточное старение, поперечные и лонгиту-

динальные исследования, а также о том, как нужно правильно снимать кривые выживания экспериментальных животных и формировать контрольную когорту.

Надо заметить, что в последние годы интерес к геронтологии резко возрос. И в первую очередь это связано с тем, что средняя продолжительность жизни людей в развитых странах резко возросла за последние десятилетия. Однако максимальная продолжительность жизни практически не изменилась (она сейчас такая же, как и тысячу лет назад, просто шансов дожить до возраста долгожителя стало гораздо больше). Если раньше часто умирали в раннем возрасте от различных не связанных с возрастом болезней (главным образом – инфекционных), то сейчас, вследствие значительных успехов медицины, большинство людей доживают до старости. В результате смерть «от старения» становится все более распространенной. В то же время многие весьма смутно представляют себе, что такое старение, каковы его механизмы и как можно с ним бороться. Даже специалисты-геронтологи достаточно часто проводят свои исследования, не учитывая хорошо известные положения «классической» науки о старении (например, определение старения как совокупности возрастных изменений, приводящих к увеличению вероятности смерти), без которых становится просто невозможным получение корректных результатов [5–7]. В частности, это касается работ, посвященных различным препаратам, предположительно замедляющим старение (геропротекторам). Очень часто их испытания проводят на модельных животных с определенными патологиями либо находящихся в неблагоприятных условиях, так что авторы не могут с уверенностью сказать, что они воздействовали на процесс старения, а не просто лечили какую-то болезнь или стимулировали защитные системы организма [8]. По-видимому, именно поэтому, как ни печально, на сегодняшний день науке не известны такие геропротекторы, которые можно было бы рекомендовать для использования у людей. Впрочем, ситуация со ставшим очень популярным ограничением питания, которое многие считают наилучшим средством борьбы со старением, тоже является весьма неоднозначной. Не исключено, что многие эксперименты, направленные на выявление возможного влияния ограничения питания на старение и продолжительность жизни, были поставлены не совсем корректно [8, 9]. Это же касается и интерпретации данных поперечных геронтологических исследований [10] или выбора корректных клеточных моделей для тестирования геропротекторов и геропротекторов [11–14].

В рамках межфакультетского курса лекций по выбору, который с 2022 г. я читаю вместе

с Г.В. Моргуновой для студентов любых других подразделений МГУ, кроме биологического факультета, рассматривается целый ряд вопросов, встающих перед современной геронтологией, финансирование которой, надо заметить, в последние годы резко возросло. По-видимому, именно последнее обстоятельство привлекло к геронтологическим исследованиям большое количество специалистов смежных специальностей, которым, на взгляд авторов курса, было бы весьма полезно ознакомиться с основами биологии старения, чтобы понять, почему мы до сих пор не живем 1000 лет. К сожалению, формируемые в настоящее время интернет-ресурсами и средствами массовой информации у рядового читателя-зрителя-слушателя представления о старении и подходах к его изучению, как правило, не вполне соответствуют истине. Например, можно найти в Интернете [страничку](#) с экспертным мнением, согласно которому «клетки условно «считают» года по количеству употребляемого человеком сахара». При этом эксперт упоминает некий белок «rage» (?), который, по его мнению, и учитывает количество сахара, «налипающего на белковые молекулы внутри тела». Про белок «rage» я ничего не смог обнаружить в Интернете. Могу только предположить, что речь идет о RAGE – рецепторе конечных продуктов гликирования [15, 16]. С его участием могут запускаться провоспалительные реакции и нейродегенеративные процессы, но про его роль в формировании биологического возраста информации мне найти не удалось. Вряд ли все это очевидно для всех пользователей Интернета, просматривающих данную страничку. Однако она очень популярна (как и сам эксперт, дающий огромное количество «геронтологических» интервью), и на нее легко найти очень много ссылок. Все это, на мой взгляд, делает весьма актуальным обучение специалистов самых разных профилей основам геронтологии и биологии старения.

Состоящий из 12 лекций [курс](#) называется «Основы биологии старения, или все, что вы хотели знать о старении (но боялись спросить)». Материал лекций был специально адаптирован для студентов, не являющихся по основной специальности биологами. Основной акцент сделан на фундаментальных определениях и методических/методологических подходах, используемых в геронтологии.

На зачете после окончания курса студентам были предложены, в числе прочих, следующие вопросы:

- 1) Что такое старение? Дайте определение и объясните, как его измерить;
- 2) Когорты и кривые выживания в экспериментально-геронтологических исследованиях;

3) Стареющие и нестареющие организмы. Дайте определения и проиллюстрируйте на примерах;

4) Основные группы теорий старения;

5) Как рассчитывается средняя ожидаемая продолжительность жизни?

6) Кривые выживания, таблицы смертности. Уравнение Гомпертца;

7) Как оценивают биологический возраст? Приведите примеры;

8) Расскажите о требованиях к маркерам биологического возраста;

9) Что такое геропротекторы и геропромоторы? Приведите примеры;

10) Расскажите об исследованиях ограничения питания в геронтологии. Каковы основные методологические проблемы таких работ?

11) Что такое лонгитудинальные и поперечные исследования? Как их проводят?

12) Расскажите о существующих моделях для изучения клеточного старения;

13) Как реализуется «бессмертие» зародышевой линии?

14) Запрограммировано ли старение? Приведите доводы за и против;

15) Расскажите о правильном выборе контрольных объектов для геронтологических экспериментов;

16) Дайте определения ускоренного и преждевременного старения. Проиллюстрируйте графиками;

17) Что такое дифференциальная смертность и секулярный тренд? Приведите примеры их влияния на интерпретацию данных геронтологических исследований;

18) Расскажите о подходах к оценке старения одноклеточных организмов;

19) Чем определяются видовые различия в продолжительности жизни?

20) Разные стратегии борьбы со старением на уровне вида;

21) Каким образом избегает старения пресноводная гидра?

22) Что такое «феномен Хейфлика»?

23) Что такое хронологическое и «стационарное» старение клеток?

24) Почему была подставлена под сомнение роль теломер и теломеразы в старении?

25) Чем определяются требования к размеру когорты в экспериментально-геронтологических исследованиях?

26) Что такое сенолитики и как их используют?

27) Какие органы человека наиболее чувствительны к старению и почему?

28) Почему фраза «мой дед пил и курил, но прожил до 100 лет» не является подтверждением безвредности алкоголизма и курения?

На одном из недавних геронтологических форумов я показал эти вопросы коллегам и спросил,

кто из них готов сдать мне зачет. Они, оценив свои возможности, как и следовало ожидать, дружно отказались.

По результатам проведенного зачета был сделан вывод о том, что отсутствие биологического образования не является препятствием для успешного изучения геронтологии. Возможно, отсутствие «геронтологического», биологического или медицинского опыта — это только плюс для восприятия нашего курса лекций. У таких слушателей глаз не «замылен» догмами, которые оказывают огромное влияние на мышление тех, кто интересуется механизмами старения и подходами к воздействию на этот процесс. Многие студенты с небиологических факультетов (а среди них были журналисты, филологи, математики, физики, химики, экономисты и др.) дали исчерпывающие ответы на сформулированные выше вопросы. В то же время некоторые слушатели (даже с «околобиологических» факультетов) практически ничего не смогли толком сказать на зачете (один из них даже полагал, что наука о старении называется «герАнтология»). Так что, как говорится, было бы желание, а остальное приложится.

Мне кажется, что большую роль в отношении слушателей к данному курсу лекций сыграла полная добровольность его выбора. На сайте межфакультетских курсов МГУ выложено огромное количество предложений лекторов с самых разных факультетов, но большинство из тех, кто слушал наш курс, выбрали его вполне сознательно. Они задавали много вопросов, свидетельствующих об искреннем интересе к проблемам геронтологии. В то же время наш с Г.В. Моргуновой межфакультетский курс МГУ по наукометрии и оформлению научных статей [17] был организован совсем по-другому. Он предназначался для аспирантов любых факультетов МГУ, но был действительно добровольным только для слушателей с других факультетов. Аспиранты же биологического факультета фактически были обязаны его посещать. И это, увы, отразилось на результатах зачета. Хорошо сдали его в основном «чужие» слушатели, а многие из «своих» (хоть и не все) сильно «хромали» на зачете. Им явно эта тема была не очень интересна. Так что, по-видимому, Дейл Карнеги был прав, когда писал в своей знаменитой книге «Как завоевывать друзей и оказывать влияние на людей» [18], что именно интерес движет почти всеми поступками людей. В том числе и в плане изучения чего-либо.

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. Khokhlov A.N. Teaching biology of aging at Moscow State University. *Gerontology*. 2001;47(Suppl. 1):537.
2. Khokhlov A.N. ABC of gerontology training at Moscow State University. *Biogerontology*. 2002;3(Suppl. 1):61.
3. Khokhlov A.N., Wei L., Li Y., He J. Teaching cytogerontology in Russia and China. *Adv. Gerontol.* 2012;25(3):513–516.
4. Wei L., Li Y., He J., Khokhlov A.N. Teaching the cell biology of aging at the Harbin Institute of Technology and Moscow State University. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012;67(1):13–16.
5. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies. *Biophysic.* 2010;55(5):859–864.
6. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors. *Curr. Aging Sci.* 2013;6(1):14–20.
7. Khokhlov A.N. Reflections of a pessimistic gerontologist or why we still do not live 1000 years? *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021;76(4):223–227.
8. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018;73(2):59–62.
9. 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;86(10):1352–1367.
10. Khokhlov A.N. On the cholesterol theory of aging-2022. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(4):292–296.
11. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014;69(1):10–14.
12. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons. *Anti-aging drugs: From basic research to clinical practice, RSC drug discovery*. Ed. A.M. Vaiserman. London; 2017:53–74.
13. 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;74(4):262–267.
14. 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;77(3):139–146.
15. Rojas A., Morales M.A., Araya P., González I. RAGE—The receptor of advanced glycation end products. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons; 2017:1–7.
16. Gasparotto J., Girardi C.S., Somensi N., Ribeiro C.T., Moreira J.C., Michels M., Sonai B., Rocha M., Steckert A.V., Barichello T., Quevedo J. Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid- $\beta$  accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment. *J. Biol. Chem.* 2018;293(1):226–244.
17. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Is it worth teaching biology students the basics of scientometrics and the instructions for the design of scientific articles, and if so, why? *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021;76(3):77–82.
18. Carnegie D. How to win friends and influence people. N.Y.: Simon & Schuster; 2009. 291 pp.

Поступила в редакцию 11.04.2023

После доработки 17.05.2023

Принята в печать 19.05.2023

## OPINION ARTICLE

## Basics of biology of aging for MSU non-biologists

A.N. Khokhlov 

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

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

The history of the creation of the course of lectures “Basics of the Biology of Aging” at the School of Biology of Lomonosov Moscow State University, as well as at the Department of Life Science and Engineering of Harbin Institute of Technology is briefly described. In the process of teaching this course, the author got the impression that its main provisions may also be of interest to students of non-biological specialties, who have recently been quite often involved in the work on the implementation of gerontological grants. This is largely determined, apparently, by the significantly increased funding for this kind of research in recent years. In turn, this is a consequence of the fact that the average life span of people in developed countries has increased dramatically over the past decades. However, the maximum life span has not changed much (it is now the same as it was thousands of years ago, it is just that the chances of living to the age of a centenarian have become much greater). If earlier people often died at an early age from various diseases not related to age (mainly infectious diseases), now, due to significant advances in medicine, most people live

to old age. As a result, death “from aging” is becoming more common. At the same time, many people have a very vague idea of what aging is, what are its mechanisms and how to fight it. In this regard, in 2022, an interschool elective course of lectures was organized at MSU for students of any departments of the university, except for the School of Biology itself. It is called “Basics of the biology of aging, or everything you wanted to know about aging (but were afraid to ask).” The material of the lectures was specially adapted for students who are not biologists by their main specialty. The main emphasis in the course, consisting of 12 lectures, is made on the fundamental definitions and methodical/methodological approaches used in gerontology. The article lists the questions submitted for the students’ test and briefly analyzes its results.

**Keywords:** *aging, gerontology, course of lectures, teaching, non-biology students, Moscow University*

**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: <https://orcid.org/0000-0001-7454-7023>

## 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 в 2021 г. составляет 0,778, показатель CiteScore 2022 (Scopus) англоязычной версии – 0,9.

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 подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

### Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (\*.doc) и Word 2007 (\*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько – по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, 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, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение, список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным

шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение – нижний колонтитул, середина страницы).

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

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

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где 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 А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное реальное (не интерполированное!) разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого его смысл не терялся и все элементы были различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

## Список литературы

Список литературы оформляется в соответствии с форматом Vancouver. Указатель литературы к статьям формируется в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту. Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и пристатейного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном – напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

*Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:*

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название журнала* (принятый сокращенный вариант). Год;том(номер):страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). *Название книги*. Город: Название издательства (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: Название издательства (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;184(3):596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеенко А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённов А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости. *Комп. исслед. моделир.* 2020;12(6):1383–1395.

**Книга:**

Holliday R. *Aging: the paradox of life: why we age*. Dordrecht: Springer; 2007. 132 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 and Protocols, vol. 2094*. Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana; 2020:39–47.

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; 2013:174–176.

**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: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

### Дополнительные правила оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м – метр, кг – килограмм, мин – минута, ° – градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия – NaCl, углекислый газ – 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 редколлегией на соответствие профилю и правилам оформления журнала. На первичное рассмотрение отводится 7–10 дней. Если в оформлении статьи обнаруживаются ошибки, ее рассмотрение занимает больше времени, так как редакторам необходимо составить список недочетов. Если работа совсем не соответствует требованиям, она возвращается авторам без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Рецензирование занимает от двух недель до месяца. Срок рецензирования включает в себя не только непосредственную работу рецензентов с рукописью, но и поиск подходящих специалистов (поиск может занять от двух дней до двух недель). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Возможно несколько раундов рецензирования, если у рецензентов возникают новые замечания или они не согласны с исправлениями и ответами авторов. Далее над рукописью работают редакторы, исправленный текст и 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.

Важно: если авторы подают статью, написанную на английском языке в русскоязычную версию журнала, она публикуется только в этой версии и не публикуется в переводной версии (Moscow University Biological Science Bulletin). Для подачи статьи в переводную версию, необходимо воспользоваться системой сайта Pleiades Publishing (<https://www.pleiades.online/ru/journal/bbscimgu/>).

### Полезные ссылки

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

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

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