



Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 78 • № 3 • 2023 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В. Физиологические эффекты полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в организме рыб 127
- Кириенко Е.С., Давидович Н.А. Особенности репродуктивной биологии представителей рода *Haslea* Simonsen (Bacillariophyta), позволяющие применять методы классической селекции 139
- Олескин А.В., Боян Ц. Взаимодействие нейротрансмиттеров с микроводорослями: концептуальные и практические аспекты 146

Оригинальные исследования

- Павлюченкова А.Н., Кутырев И.А., Федоров А.В., Челомбитко М.А., Мазур О.Е., Дугаров Ж.Н. Исследование противовоспалительных свойств секреторно-экскреторных продуктов плероцеркоидов лентеца чаечного *Dibothriocephalus dendriticus* и лигулы *Ligula interrupta* 160
- Волгушева А.А., Конюхов И.В., Антал Т.К. Оценка первичных реакций фотосинтеза в индивидуальных клетках микроводорослей микрофлуориметрическим методом 170
- Еникеев Р.Р., Захарчук Л.М. Бактерии рода *Bacillus* на Международной космической станции 178
- Тодоренко Д.А., Сидоченко Н.Д., Байжуманов А.А., Братковская Л.Б., Маторин Д.Н. Первичные процессы фотосинтеза *Thalassiosira weissflogii* при воздействии ципрофлоксацина 186
- Ездакова М.И., Матвеева Д.К., Андрианова И.В., Андреева Е.Р. Чувствительность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток к короткому гипоксическому стрессу *in vitro* зависит от эффективности гомотипической коммуникации через щелевые контакты 195
- Телегина Д.В., Пеунов Д.А., Козлова Т.А., Колосова Н.Г., Кожевникова О.С. Оценка состояния гематоретинального барьера при развитии признаков возрастной макулярной дегенерации у крыс OXYS . . . 205

Мнения

- Хохлов А.Н. Почему у пресноводной гидры не бывает болезни Альцгеймера 213

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 78 • No. 3 • 2023 • JULY — SEPTEMBER

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Reviews

- Filatova T.S., Abramochkin D.V. Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish organism 127
- Kirienko E.S., Davidovich N.A. Features of the reproductive biology of representatives of the genus *Haslea* Simonsen (Bacillariophyta), allowing the use of classical breeding methods 139
- Oleskin A.V., Boyang C. Impact of neurotransmitters on microalgae: conceptual and practical implications 146

Research articles

- Pavlyuchenkova A.N., Kutyre I.A., Fedorov A.V., Chelombitko M.A., Mazur O.E., Dugarov Z.N. Investigation of excretory/secretory products from gull-tapeworm *Dibothriocephalus dendriticus* and ligula *Ligula interrupta* plerocercoids anti-inflammatory properties 160
- Volgusheva A.A., Konyukhov I.V., Antal T.K. Evaluation of the primary reactions of photosynthesis in microalgae single cell by microfluorimetric method. 170
- Yenikeyev R.R., Zakharchuk L.M. Bacteria of the genus *Bacillus* on the Russian segment of the International Space Station 178
- Todorenko D.A., Sidochenko N.D., Baizhumanov A.A., Bratkovskaya L.B., Matorin D.N. Primary photosynthetic processes of *Thalassiosira weissflogii* under the effect of ciprofloxacin 186
- Ezdakova M.I., Matveeva D.K., Andrianova I.V., Andreeva E.R. The sensitivity of multipotent mesenchymal stromal cells to short-term hypoxic stress *in vitro* depends on the efficiency of homotypic communication through gap junctions 195
- Telegina D.V., Peunov D.A., Kozlova T.A., Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S. Evaluation of the state of the blood-retinal barrier during the development of signs of age-related macular degeneration in OXYS rats 205

Opinion articles

- Khokhlov A.N. Why freshwater hydra does not get Alzheimer's disease 213

ОБЗОР

УДК: 591.1



Физиологические эффекты полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в организме рыб

Т.С. Филатова*, Д.В. Абрамочкин

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

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

Каждый год в морские воды в результате аварий при добыче или транспортировке попадает более 1 млн тонн нефти — не считая нефтепродуктов, попадающих в океан со сточными водами. Канцерогенное действие таких компонентов нефти как бензапирен было известно с середины прошлого века. Однако после крупного разлива нефти с танкера «Eххон Valdez» в 1989 г. стало очевидно, что нефть и ее составляющие оказывают сильное токсическое влияние на организм рыб, причем в значительной степени эти эффекты обусловлены действием полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) — в частности, фенантрена. В наибольшей степени от разливов нефти страдает молодь рыб, у которой при контакте с нефтепродуктами наблюдаются аномалии развития — но влияние компонентов нефти не ограничивается тератогенными эффектами и распространяется на все возрастные когорты, вызывая у взрослых особей нарушения в функционировании нервной и сердечно-сосудистой систем и других органов, а также изменяет гормональную и осмотическую регуляцию. Как итог, наиболее крупные разливы нефти ставят под угрозу популяции важных промысловых видов рыб. Данный обзор рассматривает влияние ПАУ на физиологию основных систем органов рыб, включая как нарушения их функции, так и мальформации у молодых особей под действием нефтепродуктов. Особое внимание уделяется кардиотоксическим эффектам ди- и трициклических ПАУ, открытым недавно и потенциально являющимся не только причиной смерти животных при попадании ПАУ в водоемы, но и лежащим в основе нарушений развития.

Ключевые слова: рыба, нефть, полициклические ароматические углеводороды, фенантрен, сердце, токсикология

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

Введение

Загрязнение Мирового океана наряду с загрязнением атмосферы и глобальным потеплением является серьезной угрозой биоразнообразию флоры и фауны. Одними из важных агентов загрязнения являются ископаемые углеводороды — нефть и ее производные. Наиболее заметным источником нефтепродуктов в мировом океане являются разливы нефти при авариях во время добычи или транспортировки нефти. По последним оценкам каждый год в воды морей попадает около 1,3 млн тонн нефти, что неизбежно приводит к крайне неблагоприятным экологическим и экономическим последствиям [1, 2]. Наиболее очевидным это стало после разлива нефти с танкера

«Eххон Valdez» в заливе Принца Уильяма в 1989 г. Разлив нефти совпал с периодом нереста в этой области тихоокеанской сельди (*Clupea pallasii*) и горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*), являющихся основой рыбного промысла на Аляске, и вызвал многочисленные нарушения развития и повышенную смертность у эмбрионов и мальков рыб [3–5]. Это, в свою очередь, послужило толчком к более детальному изучению влияния нефти и ее компонентов на организмы позвоночных животных, в том числе рыб. Последние, помимо большого экономического значения для рыболовной отрасли во многих странах, являются также важными модельными объектами для изучения тех или иных токсических эффектов [6].

Впервые влияние нефти на развитие эмбрионов и мальков рыб было исследовано в середине прошлого века. Пионерские работы показали, что воздействие водорастворимой фракции нефти в низких концентрациях приводит к нарушениям развития различных органов и тканей, а при повышении концентрации вызывает смерть до окончания эмбрионального развития [7, 8]. После аварии на танкере «Eхxon Valdez» число исследований в этой области резко выросло. Перед исследователями встал вопрос не только об эффектах нефти в организмах рыб и опосредующих их механизмах, но и о том, какие именно компоненты нефти являются токсичными. Нефть является сложной смесью углеводородов различных групп — однако, несмотря на то что состав нефти может варьировать в зависимости от ее происхождения [6], влияние разных марок нефти на организм различных видов рыб — как морских, так и пресноводных — оказывается весьма сходным [10–15]. Это позволило предположить, что эффекты нефти связаны с неким ограниченным набором водорастворимых молекул, которые становятся биодоступными при контакте нефти с водой. В качестве таких агентов были предложены полиароматические углеводороды (ПАУ, также известны как полициклические ароматические углеводороды) — относительно низкомолекулярные и ограниченно растворимые в воде вещества в составе нефти, обладающие характерной химической структурой. Это органические соединения, содержащие в своей структуре

два или более конденсированных бензольных колец. ПАУ подразделяют на «легкие», содержащие в своей структуре не более трех бензольных колец, и «тяжелые», включающие четыре кольца и более. Это разделение ПАУ в зависимости от их структуры и молекулярного веса отражает различия в их физико-химических свойствах, биодоступности, токсичности — и, как выяснилось, в механизмах их влияния на живые организмы [16]. Большинство ПАУ могут содержать алкильные группы, что влияет на их растворимость, стабильность и на взаимодействие с тканями организма. До недавнего времени токсический потенциал алкилированных гомологов ПАУ практически не был исследован. К «легким» ПАУ относят нафталин, фенантрен, флуорен, антрацены, флюорантены и их алкилированные гомологи, к «тяжелым» — пирен, хризен, бензапирен, бензофлюорантен, коронен и другие. Основные классы ПАУ, содержащиеся в нефти, их молекулярная структура и концентрация в водной среде после разлива нефтепродуктов отражены на рис. 1. Стоит отметить, что помимо разливов нефти при ее транспортировке или добыче, важным источником ПАУ в водоемах являются ливневые стоки, приносящие воду от населенных пунктов и автодорог — они тоже могут быть смертельно опасны для водных организмов. Показано, что ливневые стоки с крупных автомобильных трасс, не прошедшие фильтрацию и очистку, являются причиной возросшей смертности у кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) [17].

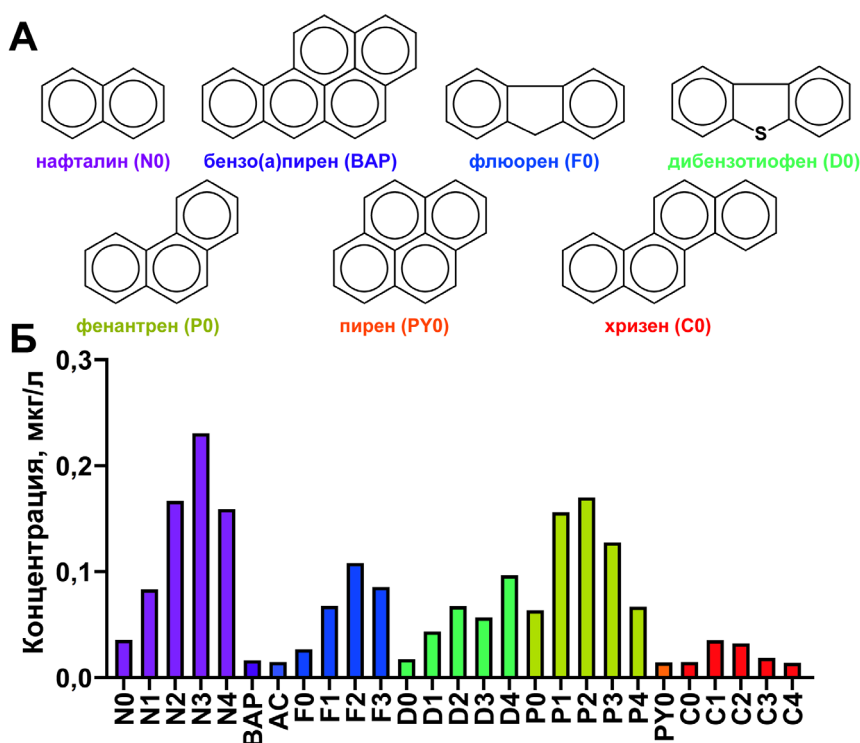


Рис. 1. Структура ПАУ и их содержание в нефти. А — молекулярная структура основных представителей ПАУ. Б — содержание ПАУ в водорастворимой фракции нефти после разлива с платформы «Deepwater Horizon» в 2010 г. Цветовой код названий соединений на панели А соответствует цветам столбцов на панели Б. Цифровые индексы обозначают число метильных групп. По данным, представленным Дж.П. Инкардоной и соавт. [1].

Эффекты тетра- и пентациклических ПАУ

В течение многих лет изучение токсикологии ПАУ было сфокусировано на исследовании действия «тяжелых» полициклических ПАУ, наиболее распространенным из которых является бензапирен. В большинстве своем «тяжелые» ПАУ, образующиеся при сгорании органических веществ, известны как сильные мутагены и канцерогены [18]; кроме того, они демонстрируют сильный тератогенный эффект. Первые свидетельства тому появились в середине прошлого века, когда при развитии химической промышленности, в особенности органического синтеза, и, соответственно, попадании в водоемы ПАУ наблюдаемые у рыб неоплазии приобрели характер эпизоотии [19]. Наиболее выраженное действие эти соединения оказывают на развивающиеся организмы. Более детальные исследования Дж. Э. Хоуз и соавт. показали, что высокомолекулярные ПАУ — в частности, бензапирен — даже в низких концентрациях (порядка нескольких нг/мл) вызывают нарушения деления клеток и, как следствие, серьезные мальформации органов и патологии тканей у эмбрионов и мальков рыб. У молоди рыб, подвергшейся воздействию бензапирена в ходе эмбрионального развития, была снижена выживаемость, также были отмечены такие нарушения развития как искривления позвоночника, деформация черепа, гидроцефалия, костные шпоры, микрофтальм; на тканевом уровне наблюдались кариопикноз и вакуолизация клеток в различных тканях [20–22]. Поскольку сходные нарушения развития наблюдались и при воздействии сырой нефти [23, 24], в течение долгого времени токсическое воздействие нефти связывали именно с бензапиреном.

Механизм действия высокомолекулярных полициклических ПАУ (включая бензапирен) связан со специфическим транскрипционным фактором, участвующим в метаболизме ксенобиотиков — рецептором арилуглеводородов (AhR) [25]. У костистых рыб из-за дупликации генома существует две изоформы AhR [26], но, по всей видимости, ПАУ в организме рыб связываются со второй изоформой рецептора [27]. Так, было показано, что нокадаун гена AhR2 подавляет тератогенные эффекты ПАУ и их галогенированных гомологов [28, 29]. «Тяжелые» ПАУ, будучи липофильными соединениями, пассивно проникают через клеточную мембрану и связываются с AhR. Это приводит к формированию молекулярного комплекса, который может связываться с ДНК и индуцировать экспрессию генов, продукты которых участвуют в метаболизме чужеродных веществ — например, цитохромы P4501A (*cyp1a*) и P4501B (*cyp1b*) [30]. В течение долгого времени считалось, что липофильные ПАУ при этом превращаются в более гидрофильные соединения, что способствует их экс-

креции [31] — однако образующиеся в результате этих реакций метаболиты могут быть достаточно химически активными: они могут участвовать в реакциях алкилирования органических макромолекул и действовать как канцерогены [32, 33]. Тем не менее, некоторые исследования ставят возможную роль этого сигнального пути под сомнение — было показано, что тератогенный эффект ПАУ, хоть и опосредован AhR2, не зависит от индукции цитохромов P450 [34]. По всей видимости, мальформации, вызванные действием ПАУ через AhR2, связаны с подавлением экспрессии важных для развития транскрипционных факторов — таких как *foxm1* и *bmpr1a* [35], но механизм этих процессов пока не раскрыт.

Среди содержащихся в нефти ПАУ, тем не менее, преобладают не «тяжелые», а «легкие», ди- и трициклические ПАУ (рис. 1Б) — такие как нафталин и фенантрен [16]. Эти соединения являются слабыми лигандами для AhR [36], поэтому до определенного момента их вклад в опосредование токсических и тератогенных эффектов нефти практически не был оценен. После разлива нефти с танкера «Exxon Valdez» в 1989 г. роль низкомолекулярных ПАУ стала более очевидной. Низкомолекулярные ди- и трициклические ПАУ обладают более высокой растворимостью в воде и быстро перемещаются в водную фракцию при попадании нефтепродуктов в водоем [37]. В работах С.Д. Райс и соавт. было показано, что при выветривании нефти с течением времени после разлива ее состав изменяется таким образом, что доля трициклических ПАУ возрастает [38, 39]. Таким образом, фокус исследований токсических и тератогенных эффектов компонентов нефти сместился в сторону низкомолекулярных ПАУ. Многочисленные работы, проведенные на различных видах рыб, показали, что нефть (в том числе выветренная) вызывает у эмбрионов и мальков рыб характерный мальформационный синдром: в первую очередь наблюдается накопление избытка жидкости в перикардимальной полости и желточном мешке (асцит) [40, 41], нарушение формирования сердца [38, 39], дефекты развития челюстей и глаз, искривление позвоночника [11]. Последующие лабораторные исследования, проведенные на данио-рерио (*Danio rerio*), показали, что отдельные трициклические ПАУ — а именно, фенантрен, флуорен и пирен — вызывают у мальков сходные нарушения развития, причем фенантрен демонстрирует более высокую токсичность по сравнению с «тяжелыми» полициклическими ПАУ [42, 43]. Более того, в исследовании группы Дж.П. Инкардоны было продемонстрировано, что токсичность сложных смесей ПАУ (к которым можно отнести нефть) зависит от содержания в них трициклических соединений, а именно фенантрена [42]. Другими исследователями было показано, что эмбрионы и мальки рыб на определенных стадиях развития за счет липофильности

компонентов нефти и высокой проницаемости покровов тела способны накапливать в своих тканях ПАУ, включая фенантрен, до микромолярных концентраций, что усугубляет токсическое воздействие этих соединений [44]. Нужно отметить, что не только молодь, но и взрослые особи промысловых видов рыб демонстрируют накопление ПАУ в тканях организма, что ставит вопрос о безопасности подобной пищевой продукции для здоровья человека [45]. Механизм действия «легких» ПАУ оказался независим от AhR: нокдаун компонентов сигнального пути, связанного с AhR, не влиял на эффекты выветренной нефти, содержащей большое количество «легких» ПАУ [11]. С другой стороны, воздействие трициклических ПАУ, в частности, фенантрена, вызывает индукцию цитохрома P4501A в различных тканях [46], а подавление экспрессии гена *cyp1a* повышает чувствительность дапто-рио к токсическим эффектам ПАУ [47], что может свидетельствовать о возможной роли этого

белка в метаболизме «легких» ПАУ. Предполагаемые пути действия «легких» и «тяжелых» ПАУ, опосредующие AhR-зависимые и AhR-независимые эффекты, просуммированы на рис. 2.

Кардиотоксичность ПАУ

Важной вехой в изучении токсичности нефти и содержащихся в ней ПАУ стало обнаружение их кардиотоксичности. Было показано, что у эмбрионов рыб вскоре после формирования сердца и установления ритма сердечных сокращений выветренная нефть (содержащая большое количество фенантрена и его производных) вызывает замедление сердечного ритма и увеличение вариабельности длительности диастолических интервалов, то есть вызывает аритмии, вплоть до атрио-вентрикулярного блока проведения, а также снижает сердечный выброс. Важно отметить при этом, что наблюдаемые нарушения в работе сердца предшествовали нарушениям развития [48].

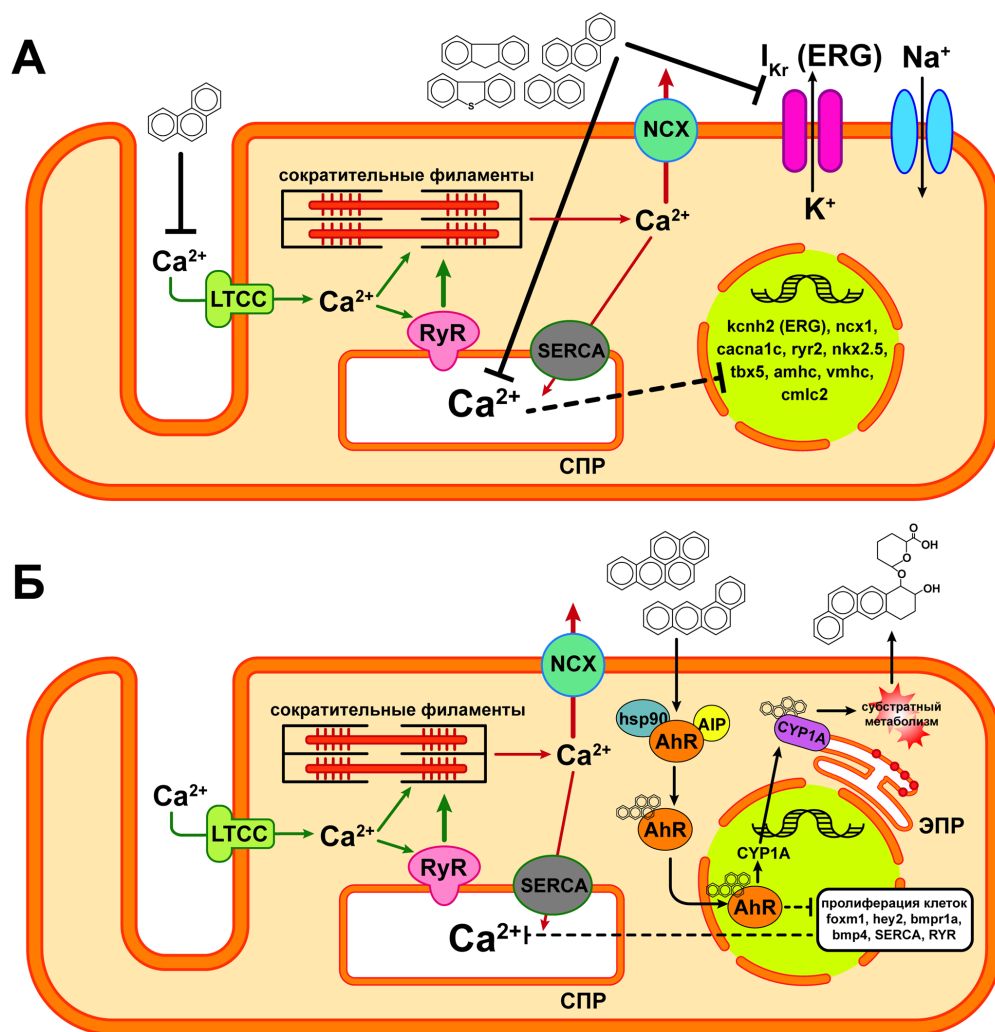


Рис. 2. Предполагаемые механизмы действия ПАУ. А – AhR-независимые кардиотоксические эффекты «легких» ди- и трициклических ПАУ (таких как нафталин и фенантрен). Б – возможный AhR-зависимый механизм действия полициклических «тяжелых» ПАУ (таких как хризен и бензапирен). AhR – арилуглеводородный рецептор; LTCC – кальциевые каналы L-типа; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; СПР – саркоплазматический ретикулум; RyR – рианодиновые рецепторы; SERCA – кальциевая помпа СПР; NCX – натрий-кальциевый обменник; I_{Kr} – быстрый калиевый ток задержанного выпрямления; CYP1A – цитохром P450 1A.

Дальнейшие исследования позволили более подробно раскрыть ионные и молекулярные механизмы действия ПАУ на сердце рыб. В масштабной работе, проведенной группой под руководством Дж.П. Инкардоны на изолированных кардиомиоцитах различных видов тунцов, было наглядно продемонстрировано изменение электрической активности клеток под действием нефти различного происхождения. В первую очередь исследователи обратили внимание на снижение в присутствии водной фракции нефти амплитуды быстрого тока задержанного выпрямления I_{Kr} , являющегося основным реполяризующим током в миокарде костистых рыб [49]. Подавление тока I_{Kr} было подтверждено в последующей работе этой же научной группы, рассматривающей действие отдельных ПАУ: было выявлено, что фенантрен в концентрации 5 мкМ подавляет I_{Kr} в кардиомиоцитах тунца более чем на 50% [50]. Ингибирование тока I_{Kr} фенантrenom было показано для кардиомиоцитов различных видов рыб, в том числе пресноводных [51–54] — причем сравнение концентраций полунингибирования показывает, что, вероятно, разные виды животных могут иметь различную чувствительность к негативным эффектам ПАУ. До недавнего времени механизм воздействия фенантрена на ток I_{Kr} был неизвестен. Недавняя работа Э. Аль-Мубарака и соавт. с использованием мутантных каналов ERG, переносящих ток I_{Kr} в клетках позвоночных животных, показали, что наиболее вероятным механизмом является прямое связывание фенантрена с поробразующими субъединицами канала в определенных сайтах внутри поры [55]. Принимая во внимание тот факт, что каналы ERG и опосредуемый ими ток I_{Kr} являются важными, если не критическими, участниками в реполяризации миокарда человека [56], ПАУ могут быть связаны с определенной долей случаев приобретенных аритмий — например, синдрома длинного интервала QT.

Недавние исследования научных групп Д.В. Абрамочкина и М. Ворнанена также показали, что ПАУ способны ингибировать в миокарде рыб быстрый натриевый ток I_{Na} , опосредующий деполяризацию миокарда в ходе генерации потенциалов действия (ПД), причем для разных видов рыб характерна разная чувствительность I_{Na} к действию ПАУ — так, натриевый ток в миокарде радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) практически нечувствителен к фенантрено и ретену, тогда как в кардиомиоцитах европейского керчака (*Myoxocephalus scorpio*) фенантрен в концентрации 10 мкМ подавляет I_{Na} более чем наполовину [52–54]. Подавление натриевого тока влечет за собой снижение скорости проведения возбуждения по миокарду, что провоцирует аритмии.

Помимо прочего, ПАУ — и в особенности фенантрен — нарушают круговорот ионов кальция и электромеханическое сопряжение в миокарде

рыб. Так, М.О. Айнеруа и соавт. показали, что фенантрен снижает силу сокращений полосок желудочкового миокарда [51]. На клеточном уровне влияние ПАУ и водной фракции нефти выражается в снижении амплитуды кальциевых транзиев, отражающих вход Ca^{2+} в цитоплазму из внешней среды и из кальциевых депо саркоплазматического ретикулума (СПР). Отчасти это происходит за счет подавления входа Ca^{2+} через сарколеммальные кальциевые каналы L-типа, опосредующие ток I_{CaL} , отчасти — за счет ингибирования кальциевой помпы SERCA, закачивающей Ca^{2+} в СПР, и подавления выхода Ca^{2+} из СПР через рианодиновые рецепторы [49–52]. В сумме, это с высокой долей вероятности ведет к ухудшению сократимости сердца и его производительности, что было подтверждено экспериментально: даже кратковременное (24 ч) воздействие сырой нефти приводило к снижению ударного объема и сердечного выброса у молодых особей махи-махи (*Coryphaena hippurus*) [57].

В большинстве опубликованных и перечисленных выше исследований ПАУ и нефть вызывали выраженное увеличение длительности потенциалов действия на уровне 90% реполяризации [49, 52, 53] — то есть, ПД приобретали «треугольную» форму, что является важным предвестником аритмических событий [58]. В основе этого, по всей видимости, лежит подавление тока задержанного выпрямления I_{Kr} , опосредующего реполяризацию миокарда рыб. С другой стороны, подавление кальциевого тока I_{CaL} под действием ПАУ является фактором, укорачивающим ПД, и суммарное изменение конфигурации ПД в миокарде рыбы зависит от чувствительности токов I_{Kr} и I_{CaL} к действию ПАУ. Так, в миокарде данио-рерио фенантрен вызывал укорочение ПД за счет более выраженного подавления кальциевого тока, уменьшая таким образом длительность рефрактерного периода и увеличивая вероятность возникновения внеочередных, проаритмических ПД [59]. В кардиомиоцитах радужной форели одновременное подавление токов I_{Kr} и I_{CaL} фенантrenom оказывали противоположное действие на длительность ПД, конфигурация электрической активности не менялась. С другой стороны, алкилированный гомолог фенантрена, ретен, вызывал укорочение ПД за счет меньшей выраженности подавления тока I_{Kr} [54]. Таким образом, влияние ПАУ на электрическую активность миокарда рыб не только видоспецифично, но также зависит от молекулярной структуры конкретного ПАУ. Нужно отметить, что помимо этих факторов влияние ПАУ в некоторой степени определяется условиями окружающей среды — например, температурой, что особенно важно ввиду неуклонно нарастающей среднегодовой температуры воды и воздуха. С одной стороны, повышенная температура способствует разрушению и испарению ПАУ

и может ослабить их неблагоприятное воздействие на организмы животных [60]. С другой стороны, исследования на полярной тресочке (*Boreogadus saida*), стенотермном виде рыб, являющемся одним из ключевых компонентов пищевых цепей в морях Арктики, показали, что повышение температуры окружающей среды даже на несколько градусов усиливает токсическое действие нефти — увеличивается частота встречаемости мальформаций и смертность у мальков, у взрослых животных наблюдается более высокая экспрессия белков-маркеров, в частности гена цитохрома *cyp1a* [61, 62]. Это значительно повышает риски для фауны в арктических водах при разливах транспортируемой по Северному морскому пути нефти.

Нарушения развития сердца под действием ПАУ

За нарушениями электрической активности сердца при воздействии ПАУ следуют нарушения в его развитии. Отчасти они вызваны влиянием ПАУ на экспрессию различных генов — например, было показано, что сырая нефть нарушает временной ход экспрессии костных морфогенетических белков, *bmp4* и *bmp10*, важных факторов роста [63], а также генов легкой (*cmlc2*) и тяжелой (*amhc*, *vmhc*) цепей миозина и транскрипционных факторов *nkx2.5* и *tbx5* [64], что влечет за собой неблагоприятные изменения в ходе кардиогенеза. Помимо генов, ответственных за формирование сердца, ПАУ в составе нефти влияют на экспрессию других генов — например, генов порообразующей субъединицы каналов ERG (*kcnh2*) и натрий-кальциевого обменника (*ncx1*) [65]. То есть, ПАУ не только вызывают проаритмические изменения в электрической активности сердца рыб, но и провоцируют долговременные изменения электрофизиологического фенотипа развивающегося сердца. С другой стороны, изменение электрической активности миокарда под действием ПАУ также может провоцировать нарушения морфогенеза (рис. 2). Ранее было известно, что вход Ca^{2+} через каналы L-типа, как и круговорот Ca^{2+} внутри клетки при участии кальциевой помпы SERCA и натрий-кальциевого обменника, критичен для развития сердца рыб [66, 67]. Недавно в своей работе Э. Сёрхус и соавт. показали, что нарушение круговорота кальция, вызываемое фенантроном, индуцирует аномалии в развитии сердца и других органов мальков рыб — аналогичные аномалии морфогенеза вызывал селективный блокатор кальциевого тока никардипин [68]. Еще одним возможным механизмом может быть нарушение экспрессии таких важных регуляторных факторов как микроРНК — предположительно, за счет метилирования ДНК под действием ПАУ [69]. Изменение траектории морфогенеза сердца под действием ПАУ может иметь видоспецифичные особенности, но однозначно неблагоприятно сказывается на жизнеспособности взрослой особи. Даже кратко-

временный контакт с ПАУ в низких концентрациях на ранних стадиях развития может повлечь за собой изменение формы желудочков, гипертрофию губчатого слоя миокарда и уменьшение толщины его компактного слоя [70, 71]. Это приводит к ухудшению сердечной функции, снижению максимальной скорости плавания взрослых рыб [72] — и, соответственно, снижает их выживаемость [73].

Влияние ПАУ на нервную систему рыб

Нарушение сердечной функции на ранних этапах развития рыб влечет за собой нарушения в развитии других органов. Результаты исследований, проведенных группой Дж.П. Инкардони на данио-рерио, позволяют предположить, что наблюдаемые при воздействии ПАУ или нефти нарушения развития могут быть по крайней мере отчасти вторичными по отношению к вызванному ими же нарушению сердечной функции [42]. Так, изменение электрической активности и снижение сердечного выброса под действием ПАУ ведет к нарушениям осморегуляции и накоплению жидкости в желточном мешке у мальков множества видов рыб [74]. Но нельзя упускать из виду и то, что нефть и ПАУ способны оказывать и непосредственное влияние на другие системы органов.

ПАУ способны вызывать изменения в работе центральной нервной системы рыб, в том числе у взрослых особей: под действием трициклических ПАУ у молодых особей дорады *Sparus aurata* снижается локомоторная активность, а под действием фенантрена ухудшается способность рыб к взаимодействию с другими особями [75]. Это, а также влияние ПАУ на периферическую нервную систему, может обуславливать снижение числа успешных попыток поимки добычи у рыб, подвергшихся воздействию ПАУ [76]. В последующих работах было показано, что ПАУ также влияют и на более сложные формы поведения — в частности, на обучение, на выбор укрытия и избегание хищников [77, 78], что указывает на нарушение работы высших нервных центров. Анализ экспрессии генов показал, что ПАУ вызывают снижение экспрессии нескольких белков, ответственных за транспорт нейромедиаторов и метаболитов, в том числе серотонина и норадреналина, а также нарушают кальциевый сигналинг в нейронах, что может иметь более глубокие последствия — например, влиять на синаптическую пластичность, процессы запоминания и обучения [79]. У красного горбыля (*Sciaenops ocellatus*) воздействие ПАУ на ранних этапах развития приводит к уменьшению размеров головного мозга, уменьшению числа нейронов и нарушению развития и функционирования синапсов [80, 81]. В периферической нервной системе ПАУ также вызывают изменения структуры и функции: помимо упомянутого выше нарушения развития глазных яблок (микрофтальм), ПАУ и сырая нефть вызывают апоптоз

клеток сетчатки и уменьшение числа синапсов. Одновременно происходит сильное снижение уровня экспрессии генов, ответственных за формирование глаза и за фототрансдукцию [82]. В поведенческих тестах это проявлялось в виде ухудшения функционирования оптокинетического рефлекса и уменьшения числа саккад [83]. ПАУ в составе сырой нефти также нарушают функционирование обонятельного анализатора: показано, что даже кратковременное воздействие выветренной водорастворимой фракции нефти ослабляет электрический ответ обонятельных клеток в ответ на те или иные обонятельные стимулы у различных видов рыб [84, 85]. При этом, как показали последующие работы, нарушения обоняния при воздействии ПАУ вызваны изменениями электрической активности нейронов, тогда как структура обонятельного эпителия остается нормальной [86]. Имеются основания предполагать, что в некоторой степени различные нарушения, вызываемые ПАУ в нервной системе и ее развитии, связаны с нарушениями кальциевого сигналинга. Поскольку ПАУ (в особенности ди- и трициклические) способны подавлять вход Ca^{2+} в клетку, а также ингибировать некоторые кальциевые помпы, их воздействие может приводить к ухудшению формирования дендритов за счет подавления сигнального пути, связанного с CREB [87] — было показано, что данный сигнальный каскад в нейронах рыб крайне подвержен действию нефти и ее компонентов [83].

Влияние ПАУ на гормональную регуляцию у рыб

Гормональная регуляция в присутствии ПАУ также оказывается нарушена. Известно, что в организме млекопитающих ПАУ нарушают сигнализацию в нескольких гормональных осях [88]. Как правило, эту роль приписывают бензапирену — известно, что его гидроксильированные метаболиты способны связываться с рецепторами эстрогенов, действуя как агонисты или антагонисты [89]. Помимо того, для рыб было показано разобщающее влияние бензапирена на гонадотропную ось за счет влияния на метаболизм андрогенов и эстрогенов [90]. Однако недавние работы продемонстрировали, что и «легкие» ПАУ способны нарушать эндокринную регуляцию в организме рыб. Так, в своей работе Л. У и соавт. показали, что фенантрен снижает концентрации соматотропного гормона и инсулиноподобного фактора роста 1 у мальков данио-рерио, препятствуя росту животных, что может отрицательно сказаться на их выживании [91]. Помимо этого, фенантрен оказывает дизруптивное влияние на тиреоидную гормональную ось, но данные касательно его влияния на секрецию трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4) разнятся: некоторые исследователи показали снижение уровня Т4 и повышение уровня Т3 под действием фенантрена [91], тогда как в других ра-

ботах показано снижение уровней как Т3, так и Т4 [92, 93]. Механизм этого эффекта фенантрена пока слабо исследован. Л. Чжун и соавт. доказали, что фенантрен влияет на экспрессию генов, связанных с работой тиреоидной регуляторной оси — причем его эффекты полостспецифичны [93]. Фенантрен также оказывает влияние на гонадотропную ось: на различных видах рыб было показано, что в присутствии фенантрена снижается секреция эстрогена, тестостерона и вителлогенина у женских особей, снижается уровень экспрессии генов, связанных с функционированием гонадотропной оси (гены гонадолиберина, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, рецепторов эстрогена), у женских особей уменьшается количество формирующейся икры. Кроме того, эмбрионы, полученные от родительских особей, подвергшихся воздействию фенантрена, выказывают сниженную выживаемость и увеличенную частоту нарушений в развитии [94, 95]. Таким образом, неблагоприятные эффекты ПАУ могут сохраняться в нескольких поколениях.

Влияние ПАУ на осморегуляцию и пищеварение рыб

Достаточно ранние исследования показали, что воздействие нефти меняет ионный и электролитный баланс в организме рыб: у морских рыб, подвергшихся воздействию нефти, наблюдалось повышение концентраций Na^+ и Cl^- в плазме крови, а у пресноводных — напротив, снижение концентраций этих ионов [96, 97]. Отчасти причиной этого могут быть гистопатологические изменения в жабрах, вызванные ПАУ, выражающиеся в нарушении структуры жаберного эпителия и его гиперплазии [96, 98]. С другой стороны, ПАУ могут напрямую влиять на транспорт ионов и, соответственно, на осморегуляцию: было показано, что «легкие» ПАУ — в частности, нафталин — ингибируют активность Na^+/K^+ -АТФазы, одного из основных ионных транспортеров, участвующих в регуляции электролитного баланса [99]. Поскольку Na^+ и Cl^- в жабрах рыб транспортируются в обмен на ионы H^+ и HCO_3^- , можно предположить, что ПАУ способны нарушать и кислотно-основной баланс в организме рыб. Прямых доказательств этому на данный момент нет, однако в работе Л.Р. Соуза-Бастос и К.А. Фрейре было показано, что в жабрах рыб, подвергшихся воздействию нефти после ее разлива с танкера «Vikunja» в 2004 г., была снижена активность карбоангидразы [100]. К сожалению, влияние ПАУ и нефти на осморегуляцию у рыб практически не исследовано — большинство работ в этой области рассматривают только нарушения ионного транспорта в жабрах ввиду того, что прямое действие компонентов нефти на почки менее вероятно. Однако выраженная индукция цитохрома P4501A в тканях почек может свидетельствовать о том, что ПАУ оказывают влияние на их функцию [101].

Влияние ПАУ на функции желудочно-кишечного тракта рыб исследовано слабо — тем не менее, очевидно, что в областях, загрязненных нефтепродуктами, ПАУ могут попадать в организм рыб через пищеварительный тракт. В самом деле, исследование С. Майер и соавт. показало, что как нефть, так и смесь ПАУ при оральном введении вызывают у пикши (*Melanogrammus aeglefinus*) выраженную индукцию цитохрома P4501A и образование ДНК-аддуктов не только в печени, активно участвующей в метаболизме ксенобиотиков, но и в тканях кишечника, что указывает на важную роль желудочно-кишечного тракта как барьера, участвующего в нейтрализации ПАУ [102]. Будучи липофильными соединениями, ПАУ растворяются в жировых каплях и мицеллах в полости кишечника [103], где могут влиять на активность липазы и переваривание жиров. Было показано, что как «тяжелые», так и «легкие» ПАУ подавляют активность панкреатической липазы радужной форели (*Parasalmo mykiss*). Это ухудшает переваривание жиров, в особенности липидов растительного происхождения [104].

Заключение

Таким образом, нефть и ее компоненты оказывают неблагоприятное многостороннее воздействие на организм рыб; некоторые из этих эффектов могут сохраняться у последующих поколений животных. Последние работы наглядно показывают, что ведущую роль в этих процессах играют ди- и трициклические ПАУ, характеризующиеся высокой степенью кардиотоксичности. «Тяжелые» полициклические ПАУ оказывают тератогенное и канцерогенное влияние, действуя через AhR. По всей видимости, именно кардиотоксические эф-

фекты ПАУ могут быть основной причиной высокой смертности рыб при разливах нефти и лежать в основе последующего отложенного влияния на другие системы органов и на развитие молоди рыб. Наряду с острыми кардиотоксическими эффектами ПАУ вызывают у рыб нарушения локомоции, ухудшение зрения и обоняния, нарушают работу различных гормональных осей, ухудшают осморегуляцию — как у морских, так и у пресноводных видов — а также подавляют пищеварение. Несмотря на то что физиологические эффекты ПАУ активно исследуются, молекулярные механизмы их действия и участвующие в этом сигнальные каскады остаются практически неизученными — известно, что некоторые ПАУ могут напрямую связываться с ионными каналами в мембране клеток, но природа их влияния на ионные насосы и экспрессию генов в различных органах и тканях пока неясна. Кроме того, имеющиеся данные касательно влияния ПАУ на другие системы органов, помимо сердца, довольно малочисленны и отрывочны — например, практически не изучено влияние ПАУ на функцию почек и на сосудистую систему рыб. Это представляется весьма актуальным направлением исследований ввиду быстрого развития нефтедобывающей отрасли, в том числе шельфовой добычи, сопряженной с повышением риска разливов нефти и загрязнения водоемов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №22-14-00075) и проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eckle P., Burgherr P., Michaux E. Risk of large oil spills: A statistical analysis in the aftermath of deepwater horizon. *Environ. Sci. Technol.* 2012;46(23):13002–13008.
2. Council N.R. Oil in the sea III: Inputs, fates, and effects. Washington: The National Academies Press; 2002.
3. McGurk M.D., Brown E.D. Egg-larval mortality of Pacific herring in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996;53(10):2343–2354.
4. Hose J.E., McGurk M.D., Marty G.D., Hinton D.E., Brown E.D., Baker T.T. Sublethal effects of the (Exxon Valdez) oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989–1991. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996;53(10):2355–2365.
5. Norcross B.L., Hose J.E., Frandsen M., Brown E.D. Distribution, abundance, morphological condition, and cytogenetic abnormalities of larval herring in Prince William Sound, Alaska, following the (Exxon Valdez) oil spill. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996;53(10):2376–2387.
6. Carvan M.J., Gallagher E.P., Goksøyr A., Hahn M.E., Joakim Larsson D.G. Fish models in toxicology. *Zebrafish.* 2007;4(1):9–20.
7. Ernst V.V., Neff J.M., Anderson J.W. The effects of the water-soluble fractions of no. 2 fuel oil on the early development of the estuarine fish, *Fundulus grandis baird* and *girard*. *Environ. Pollut.* 1977;14(1):25–35.
8. Lindén O. Biological effects of oil on early development of the Baltic herring *Clupea harengus membras*. *Mar. Biol.* 1978;45(3):273–283.
9. Wang Z., Stout S.A., Fingas M. Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification. *Environmental Forensics.* 2007;7(2):105–146.
10. Adeyemo O.K., Kroll K.J., Denslow N.D. Developmental abnormalities and differential expression of genes induced in oil and dispersant exposed *Menidia beryllina* embryos. *Aquat. Toxicol.* 2015;168:60–71.
11. Incardona J.P., Carls M.G., Teraoka H., Sloan C.A., Collier T.K., Scholz N.L. Aryl Hydrocarbon Receptor–Independent Toxicity of Weathered Crude Oil during Fish Development. *Environ. Health Perspect.* 2005;113(12):1755–1762.
12. Jung J.H., Hicken C.E., Boyd D., Anulacion B.F., Carls M.G., Shim W.J., Incardona J.P. Geologically distinct

crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish. *Chemosphere*. 2013;91(8):1146–1155.

13. McIntosh S., King T., Wu D., Hodson P.V. Toxicity of dispersed weathered crude oil to early life stages of Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 2010;29(5):1160–1167.

14. Mu J., Jin F., Ma X., Lin Z., Wang J. Comparative effects of biological and chemical dispersants on the bioavailability and toxicity of crude oil to early life stages of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environ. Toxicol. Chem.* 2014;33(11):2576–2583.

15. Pollino C.A., Holdway D.A. Toxicity testing of crude oil and related compounds using early life stages of the crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2002;52(3):180–189.

16. Lawal A.T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environ. Sci.* 2017;3(1):1339841.

17. Spromberg J.A., Baldwin D.H., Damm S.E., McIntyre J.K., Huff M., Sloan C.A., Anulacion B.F., Davis J.W., Scholz N.L. Coho salmon spawner mortality in western US urban watersheds: bioinfiltration prevents lethal storm water impacts. *J. Appl. Ecol.* 2016;53(2):398–407.

18. Menzie C.A., Potocki B.B., Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 1992;26(7):1278–1284.

19. Bunton T.E. Experimental chemical carcinogenesis in fish. *Toxicol. Pathol.* 1996;24(5):603–618.

20. Hose J.E., Hannaht J.B., Puffer H.W., Landolt M.L. Histologic and skeletal abnormalities in benzo(a)pyrene-treated rainbow trout alevins. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1984;13(6):675–684.

21. Hose J.E., Hannah J.B., DiJulio D., Landolt M.L., Miller B.S., Iwaoka W.T., Felton S.P. Effects of benzo(a)pyrene on early development of flatfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1982;11(2):167–171.

22. Hannah J.B., Hose J.E., Landolt M.L., Miller B.S., Felton S.P., Iwaoka W.T. Benzo(a)pyrene-induced morphologic and developmental abnormalities in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1982;11(6):727–734.

23. Lonning S. The effects of crude Ekofisk oil and oil products on marine fish larvae. *Astarte J. Arct. Biol.* 1977;10:37–48.

24. Malins D.C. Alterations in the cellular and subcellular structure of marine teleosts and invertebrates exposed to petroleum in the laboratory and field: a critical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1982;39(6):877–889.

25. Denison M.S., Seidel S.D., Rogers W.J., Ziccardi M., Winter G.M., Heath-Pagliuso S. Natural and synthetic ligands for the Ah receptor. In: Puga A., Wallace K.B., editors. *Molecular Biology Approaches to Toxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis; 1998:393–410.

26. Hahn M.E., Karchner S.I., Evans B.R., Franks D.G., Merson R.R., Lapseritis J.M. Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 2006;305A(9):693–706.

27. Billiard S.M., Timme-Laragy A.R., Wassenberg D.M., Cockman C., Di Giulio R.T. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicol. Sci.* 2006;92(2):526–536.

28. Clark B.W., Matson C.W., Jung D., Di Giulio R.T. AHR2 mediates cardiac teratogenesis of polycyclic aromatic hydrocarbons and PCB-126 in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 2010;99(2):232–240.

29. Prasch A.L., Teraoka H., Carney S.A., Dong W., Hiraga T., Stegeman J.J., Heideman W., Peterson R.E. Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish. *Toxicol. Sci.* 2003;76(1):138–150.

30. Denison M.S., Nagy S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev.* 2003;43:309–334.

31. Gohlke J.M., Doke D., Tipre M., Leader M., Fitzgerald T. A review of seafood safety after the Deepwater Horizon blowout. *Environ. Health Perspect.* 2011;119(8):1062–1069.

32. Denison M.S., Fisher J.M., Whitlock J.P. Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988;85(8):2528–2532.

33. Korashy H., El-Kadi A. The role of aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Drug Metab. Rev.* 2006;38(3):411–450.

34. Carney S.A., Peterson R.E., Heideman W. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. *Mol. Pharmacol.* 2004;66(3):512–521.

35. Carney S.A., Chen J., Burns C.G., Xiong K.M., Peterson R.E., Heideman W. Aryl hydrocarbon receptor activation produces heart-specific transcriptional and toxic responses in developing zebrafish. *Mol. Pharmacol.* 2006;70(2):549–561.

36. Barron M.G., Heintz R., Rice S.D. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar. Environ. Res.* 2004;58(2–5):95–100.

37. Wang Z., Fingas M.F. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Mar. Pollut. Bull.* 2003;47(9–12):423–452.

38. Carls M.G., Rice S.D., Hose J.E. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ. Toxicol. Chem.* 1999;18(3):481–493.

39. Heintz R.A., Short J.W., Rice S.D. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 1999;18(3):494–503.

40. Marty G.D., Short J.W., Dambach D.M., Willits N.H., Heintz R.A., Rice S.D., Stegeman J.J., Hinton D.E. Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis, and cytochrome P4501A induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil-contaminated gravel during development. *Can. J. Zool.* 1997;75(6):989–1007.

41. Marty G.D., Hose J.E., McGurk M.D., Brown E.D., Hinton D.E. Histopathology and cytogenetic evaluation of Pacific herring larvae exposed to petroleum hydrocarbons in the laboratory or in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1997;54(8):1846–1857.

42. Incardona J.P., Collier T.K., Scholz N.L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004;196(2):191–205.

43. Xu K., Zhang Y., Zheng J., Wang C., Chen R. Comparative toxicity of 3–5 ringed polycyclic aromatic hydrocarbons to skeletal development in zebrafish embryos and the possible reason. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2023;110(1):8.
44. Petersen G.I., Kristensen P. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. *Environ. Toxicol. Chem.* 1998;17(7):1385–1395.
45. de Pinho J.V., Lopes A.P., de Almeida Rodrigues P., Ferrari R.G., Hauser-Davis R.A., Conte-Junior C.A. Food safety concerns on polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in fish products from estuarine bays throughout the American continent. *Sci. Total Environ.* 2023;858(Part 2):159930.
46. Rusni S., Sassa M., Takehana Y., Kinoshita M., Inoue K. Correlation between cytochrome P450 1A (cyp1a) mRNA expression and ambient phenanthrene and pyrene concentration in Japanese Medaka *Oryzias latipes*. *Fish. Sci.* 2020;86(4):605–613.
47. Xie S., Feng Y., Zhou A., Lu Z., Zou J. Comparative analysis of two new zebrafish models: The cyp1a low-expression line and cyp1a knockout line under PAHs exposure. *Gene.* 2023;869:147391.
48. Incardona J.P., Carls M.G., Day H.L., Sloan C.A., Bolton J.L., Collier T.K., Scholz N.L. Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering. *Environ. Sci. Technol.* 2009;43(1):201–207.
49. Brette F., Machado B., Cros C., Incardona J.P., Scholz N.L., Block B.A. Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Science.* 2014;343(6172):772–776.
50. Brette F., Shiels H.A., Galli G.L.J., Cros C., Incardona J.P., Scholz N.L., Block B.A. A novel cardiotoxic mechanism for a pervasive global pollutant. *Sci. Rep.* 2017;7:41476.
51. Ainerua M.O., Tinwell J., Kompella S.N., Sørhus E., White K.N., van Dongen B.E., Shiels H.A. Understanding the cardiac toxicity of the anthropogenic pollutant phenanthrene on the freshwater indicator species, the brown trout (*Salmo trutta*): From whole heart to cardiomyocytes. *Chemosphere.* 2020;239:124608.
52. Abramochkin D.V., Kompella S.N., Shiels H.A. Phenanthrene alters the electrical activity of atrial and ventricular myocytes of a polar fish, the Navaga cod. *Aquat. Toxicol.* 2021;235:105823.
53. Filatova T.S., Mikhailova V.B., Guskova V.O., Abramochkin D.V. The effects of phenanthrene on the electrical activity in the heart of shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpio*). *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(1):S44–S51.
54. Vehniäinen E.R., Haverinen J., Vornanen M. Polycyclic aromatic hydrocarbons phenanthrene and retene modify the action potential via multiple ion currents in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cardiac myocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 2019;38(10):2145–2153.
55. Al-Moubarak E., Shiels H.A., Zhang Y., Du C., Hanington O., Harmer S.C., Dempsey C.E., Hancox J.C. Inhibition of the hERG potassium channel by phenanthrene: a polycyclic aromatic hydrocarbon pollutant. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021;78(23):7899–7914.
56. Sanguinetti M.C., Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature.* 2006;440(7083):463–469.
57. Nelson D., Heuer R.M., Cox G.K., Stieglitz J.D., Hoenig R., Mager E.M., Benetti D.D., Grosell M., Crossley D.A. Effects of crude oil on in situ cardiac function in young adult mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Aquat. Toxicol.* 2016;180:274–281.
58. Hondeghem L.M., Carlsson L., Duker G. Instability and triangulation of the action potential predict serious proarrhythmia, but action potential duration prolongation is antiarrhythmic. *Circulation.* 2001;103(15):2004–2013.
59. Kompella S.N., Brette F., Hancox J.C., Shiels H.A. Phenanthrene impacts zebrafish cardiomyocyte excitability by inhibiting IKr and shortening action potential duration. *J. Gen. Physiol.* 2021;153(2):e202012733.
60. Abrajano T.A., Yan B., O'Malley V. High molecular weight petrogenic and pyrogenic hydrocarbons in aquatic environments. *Environmental geochemistry, vol. 9.* Ed. B.S. Lollar. Elsevier; 2004:475–509.
61. Andersen Ø., Frantzen M., Rosland M., Timmerhaus G., Skugor A., Krasnov A. Effects of crude oil exposure and elevated temperature on the liver transcriptome of polar cod (*Boreogadus saida*). *Aquat. Toxicol.* 2015;165:9–18.
62. Bender M.L., Giebichenstein J., Teisrud R.N., Laurent J., Frantzen M., Meador J.P., Sørensen L., Hansen B.H., Reinardy H.C., Laurel B., Nahrang J. Combined effects of crude oil exposure and warming on eggs and larvae of an arctic forage fish. *Sci. Rep.* 2021;11(1):8410.
63. Sørhus E., Incardona J.P., Furmanek T., Goetz G.W., Scholz N.L., Meier S., Edvardsen R.B., Jentoft S. Novel adverse outcome pathways revealed by chemical genetics in a developing marine fish. *eLife.* 2017;6:e20707.
64. Edmunds R.C., Gill J.A., Baldwin D.H., Linbo T.L., French B.L., Brown T.L., Esbaugh A.J., Mager E.M., Stieglitz J., Hoenig R., Benetti D., Grosell M., Scholz N.L., Incardona J.P. Corresponding morphological and molecular indicators of crude oil toxicity to the developing hearts of mahi mahi. *Sci. Rep.* 2015;5(1):17326.
65. Sørhus E., Incardona J.P., Karlsen Ø., Linbo T., Sørensen L., Nordtug T., Van Der Meeren T., Thorsen A., Thorbjørnsen M., Jentoft S., Edvardsen R.B., Meier S. Crude oil exposures reveal roles for intracellular calcium cycling in haddock craniofacial and cardiac development. *Sci. Rep.* 2016;6(1):31058.
66. Ebert A.M., Hume G.L., Warren K.S., Cook N.P., Burns C.G., Mohideen M.A., Siegal G., Yelon D., Fishman M.C., Garrity D.M. Calcium extrusion is critical for cardiac morphogenesis and rhythm in embryonic zebrafish hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(49):17705–17710.
67. Rottbauer W., Baker K., Wo Z.G., Mohideen M.A.P.K., Cantiello H.F., Fishman M.C. Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-Type calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Dev. Cell.* 2001;1(2):265–275.
68. Sørhus E., Nakken C.L., Donald C.E., Ripley D.M., Shiels H.A., Meier S. Cardiac toxicity of phenanthrene depends on developmental stage in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Sci. Total Environ.* 2023;881:163484.
69. Huang L., Xi Z., Wang C., Zhang Y., Yang Z., Zhang S., Chen Y., Zuo Z. Phenanthrene exposure induces cardiac hypertrophy via reducing miR-133a expression by DNA methylation. *Sci. Rep.* 2016;6(1):20105.
70. Hicken C.E., Linbo T.L., Baldwin D.H., Willis M.L., Myers M.S., Holland L., Larsen M., Stekol M.S., Rice S.D., Collier T.K., Scholz N.L., Incardona J.P. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac mor-

- phology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(17):7086–7090.
71. Incardona J.P., Carls M.G., Holland L., Linbo T.L., Baldwin D.H., Myers M.S., Peck K.A., Tagal M., Rice S.D., Scholz N.L. Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring. *Sci. Rep.* 2015;5(1):13499.
72. Anttila K., Jørgensen S.M., Casselman M.T., Timmerhaus G., Farrell A.P., Takle H. Association between swimming performance, cardiorespiratory morphometry, and thermal tolerance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Front. Mar. Sci.* 2014;1:76.
73. Heintz R.A., Rice S.D., Wertheimer A.C., Bradshaw R.F., Thrower F.P., Joyce J.E., Short J.W. Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2000;208:205–216.
74. Incardona J.P., Scholz N.L. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. *Aquat. Toxicol.* 2016;177:515–525.
75. Gonçalves R., Scholze M., Ferreira A.M., Martins M., Correia A.D. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environ. Res.* 2008;108(2):205–213.
76. Carvalho P.S.M., Kalil D. da C.B., Novelli G.A.A., Bainy A.C.D., Fraga A.P.M. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus brasiliensis*. *Mar. Environ. Res.* 2008;66(1):205–207.
77. Johansen J.L., Allan B.J.M., Rummer J.L., Esbaugh A.J. Oil exposure disrupts early life-history stages of coral reef fishes via behavioural impairments. *Nat. Ecol. Evol.* 2017;1(8):1146–1152.
78. Geier M.C., Minick J.D., Truong L., Tilton S., Pande P., Anderson K.A., Teeguardan J., Tanguay R.L. Systematic developmental neurotoxicity assessment of a representative PAH superfund mixture using zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018;354:115–125.
79. Xu E.G., Mager E.M., Grosell M., Pasparakis C., Schlenker L.S., Stieglitz J.D., Benetti D., Hazard E.S., Courtney S.M., Diamante G., Freitas J., Hardiman G., Schlenk D. Time- and oil-dependent transcriptomic and physiological responses to Deepwater Horizon oil in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) embryos and larvae. *Environ. Sci. Technol.* 2016;50(14):7842–7851.
80. Xu E.G., Khursigara A.J., Magnuson J., Hazard E.S., Hardiman G., Esbaugh A.J., Roberts A.P. and Schlenk D. Larval red drum (*Sciaenops ocellatus*) sublethal exposure to weathered Deepwater Horizon crude oil: developmental and transcriptomic consequences. *Environ. Sci. Technol.* 2017;51(17):10162–10172.
81. Khursigara A.J., Ackerly K.L., Esbaugh A.J. Pyrene drives reduced brain size during early life exposure in an estuarine fish, the red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 2022;259:109397.
82. Magnuson J.T., Bautista N.M., Lucero J.A., Lund A.K., Xu E.G., Schlenk D., Burggren W.W., Roberts A.P. Exposure to crude oil induces retinal apoptosis and impairs visual function in fish. *Environ. Sci. Technol.* 2020;54(5):2843–2850.
83. Magnuson J.T., Khursigara A.J., Allmon E.B., Esbaugh A.J., Roberts A.P. Effects of Deepwater Horizon crude oil on ocular development in two estuarine fish species, red drum (*Sciaenops ocellatus*) and sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018;166:186–191.
84. Cave E.J., Kajiura S.M. Effect of Deepwater Horizon crude oil water accommodated fraction on olfactory function in the atlantic stingray, *Hypanus sabinus*. *Sci. Rep.* 2018;8(1):15786.
85. Schlenker L.S., Welch M.J., Meredith T.L., Mager E.M., Lari E., Babcock E.A., Pyle G.G., Munday P.L., Grosell M. Damsels in distress: oil exposure modifies behavior and olfaction in bicolor damselfish (*Stegastes partitus*). *Environ. Sci. Technol.* 2019;53(18):10993–11001.
86. Lari E., Steinkey D., Razmara P., Mohaddes E., Pyle G.G. Oil sands process-affected water impairs the olfactory system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019;170:62–67.
87. Redmond L., Kashani A.H., Ghosh A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron.* 2002;34(6):999–1010.
88. Zhang Y., Dong S., Wang H., Tao S., Kiyama R. Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. *Environ. Pollut.* 2016;213:809–824.
89. Hayakawa K., Onoda Y., Tachikawa C., Hosoi S., Yoshita M., Sang W.C., Kizu R., Toriba A., Kameda T., Tang N. Estrogenic/antiestrogenic activities of polycyclic aromatic hydrocarbons and their monohydroxylated derivatives by yeast two-hybrid assay. *J. Heal. Sci.* 2007;53(5):562–570.
90. Colli-Dula R.C., Fang X., Moraga-Amador D., Albornoz-Abud N., Zamora-Bustillos R., Conesa A., Zapata-Perez O., Moreno D., Hernandez-Nuñez E. Transcriptome analysis reveals novel insights into the response of low-dose benzo(a)pyrene exposure in male tilapia. *Aquat. Toxicol.* 2018;201:162–173.
91. Wu L., Zhong L., Ru H., Yao F., Ni Z., Li Y. Thyroid disruption and growth inhibition of zebrafish embryos/larvae by phenanthrene treatment at environmentally relevant concentrations. *Aquat. Toxicol.* 2022;243:106053.
92. Mousavi A., Salamat N., Safahieh A. Phenanthrene disrupting effects on the thyroid system of Arabian seabream, *Acanthopagrus arabicus*: *In situ* and *in vivo* study. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 2022;252:109226.
93. Zhong L., Wu L., Ru H., Wei N., Yao F., Zhang H., Ni Z., Duan X., Li Y. Sex-specific thyroid disruption caused by phenanthrene in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 2023;263:109484.
94. Sun L., Zuo Z., Chen M., Chen Y., Wang C. Reproductive and transgenerational toxicities of phenanthrene on female marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquat. Toxicol.* 2015;162:109–116.
95. Peng X., Sun X., Yu M., Fu W., Chen H., Chen J. Chronic exposure to environmental concentrations of phenanthrene impairs zebrafish reproduction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019;182:109376.
96. Kennedy C.J., Farrell A.P. Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasi*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 2005;323(1):43–56.

97. Zbanyszek R., Smith L.S. The effect of water-soluble aromatic hydrocarbons on some haematological parameters of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, during acute exposure. *J. Fish Biol.* 1984;24(5):545–552.
98. Katsumiti A., Domingos F.X.V., Azevedo M., da Silva M.D., Damian R.C., Almeida M.I.M., de Assis H.C.S., Cestari M.M., Randi M.A.F., Ribeiro C.A.O., Freire C.A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 2009;152(1–4):209–222.
99. Dangé A.D. Branchial Na⁺/K⁺-ATPase inhibition in a freshwater euryhaline teleost, tilapia (*Oreochromis mossambicus*), during short-term exposure to toluene or naphthalene: Influence of salinity. *Environ. Pollut. Ser. A, Ecol. Biol.* 1986;42(3):273–286.
100. Souza-Bastos L.R., Freire C.A. Osmoregulation of the resident estuarine fish *Atherinella brasiliensis* was still affected by an oil spill (Vicuña tanker, Paranaguá Bay, Brazil), 7 months after the accident. *Sci. Total Environ.* 2011;409(7):1229–1234.
101. Sarasquete C., Segner H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci. Total Environ.* 2000;247(2–3):313–332.
102. Meier S., Karlsen Ø., Le Goff J., et al. DNA damage and health effects in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to PAHs associated with oil-polluted sediment or produced water. *PLoS One.* 2020;15(10):e0240307.
103. Kelly B.C., Gobas F.A.P.C., McLachlan M.S. Intestinal absorption and biomagnification of organic contaminants in fish, wildlife, and humans. *Environ. Toxicol. Chem.* 2004;23(10):2324–2336.
104. de Gelder S., Sæle Ø., de Veen B.T.H., Vos J., Flik G., Berntssen M.H.G., Klaren P.H.M. The polycyclic aromatic hydrocarbons benzo[a]pyrene and phenanthrene inhibit intestinal lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 2017;198:1–8.
105. Incardona J.P., Scholz N.L. Case study: The 2010 Deepwater Horizon oil spill and its environmental developmental impacts. *Development and Environment*. Eds. W. Burggren and B. Dubansky. Cham: Springer; 2018:235–283.

Поступила в редакцию 11.05.2023

После доработки 24.08.2023

Принята в печать 12.09.2023

REVIEW

Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish organism

T.S. Filatova* , D.V. Abramochkin 

Department of Human and Animal Physiology, Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

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

The pollution of world ocean is a serious threat to the biodiversity of flora and fauna. One of the most important sources of pollution are oil and oil products – every year more than 1 million tons of oil is spilled into the sea as a result of accidents during oil production or transportation. The teratogenic and carcinogenic effects of such oil components as benzopyrene is well known since the middle of the last century. However, after a large oil spill from “Exxon Valdez” tanker in 1989 it became clear that oil and its components have strong toxic effects in fish organism – and to a large extent these effects are caused by di- and tricyclic aromatic hydrocarbons, in particular phenanthrene. Field research have demonstrated that fish embryo and larvae are the most prone to the effects of oil – and the largest oil spills endanger the populations of important commercial fish species that spawn in this area. This review considers the influence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the physiology of various organ systems in fish. Particular attention is paid to the cardiotoxic effects of PAH which were recently discovered and which are potentially not only the main cause of animals’ death upon the spill of PAH into water, but also underlie the malformation of other organs.

Keywords: fish, oil, polycyclic aromatic hydrocarbons, phenanthrene, heart, toxicology

Funding: The research was supported by Russian Science Foundation, project number 22-14-00075.

Сведения об авторах

Филатова Татьяна Сергеевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. 8-929-515-25-78; e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0131-1911>

Абрамочкин Денис Валерьевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. 8-916-603-05-02; e-mail: abram340@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5751-8853>

ОБЗОР

УДК 582.26:631.527



Особенности репродуктивной биологии представителей рода *Haslea* Simonsen (Bacillariophyta), позволяющие применять методы классической селекции

Е.С. Кириенко* , Н.А. Давидович

Карадагская научная станция имени Т.И. Вяземского — природный заповедник Российской академии наук — филиал Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», Россия, 298188, Республика Крым, г. Феодосия, пгт Курортное, ул. Науки, д. 24

*e-mail: esk-00@bk.ru

Рассматривается применение классической селекции диатомовых водорослей на примере рода *Haslea*. Способность некоторых представителей этого рода синтезировать мареннин и мареннин-подобные пигменты интересует исследователей и держателей устричных ферм в связи с тем, что эти уникальные пигменты окрашивают ткани моллюсков в зеленоватый цвет и улучшают их органолептические свойства. Показано, что мареннин обладает антибактериальной, противовирусной, антиоксидантной и другими биологическими активностями. Предполагается, что эффективность биосинтеза мареннина может быть повышена благодаря получению высокопродуктивных штаммов путем селекции, которая ранее у диатомовых не осуществлялась. Дана оценка возможности и проанализированы перспективы применения методов классической селекции в отношении представителей рода *Haslea*. Показано, что к настоящему времени достигнут значительный успех в изучении жизненного цикла, систем скрещивания и других особенностей репродуктивной биологии представителей рода *Haslea*, что позволяет осуществить их классическую селекцию путем отбора, гибридизации и получения потомков следующего поколения.

Ключевые слова: *Haslea*, диатомовые водоросли, классическая селекция, мареннин, аквакультура, гетероталлизм

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-9

Введение

Микроводоросли представляют практический интерес в сфере биотехнологического производства. Благодаря большому содержанию жиров, углеводов, витаминов, иных биологически активных веществ, этими объектами заинтересовались и начали их культивировать в промышленных масштабах еще во второй половине XX в. В то время наибольший интерес представляли зеленые водоросли и цианобактерии, отчасти из-за их относительной нетребовательности к условиям содержания и составу культуральной среды. В последние десятилетия специалисты все чаще стали уделять внимание диатомовым водорослям, способным продуцировать ценные вещества, которые используются в производстве медицинских препаратов, косметических средств [1], а также в виде живых кормов [2].

Среди пенистых диатомовых одним из примечательных является род *Haslea* Simonsen, отдельные представители которого способны синтезировать уникальные пигменты голубого цвета, относящиеся к группе мареннинов [3]. Ценность

этих пигментов заключается не только в их антиоксидантной и антибактериальной активностях [4], но и в способности окрашивать ткани устриц в синевато-зеленый цвет [5]. Первое литературное упоминание о «зеленых устрицах» относится к XVII в., когда Томас Спрат [6] наблюдал «озеленение» пруда для выращивания устриц близ Колчестера в Англии. Эту особенность применяют в своей практике держатели устричных ферм, прежде всего на Атлантическом побережье Франции [7]. Окрашенные устрицы, содержащиеся в прудах, в которых массово развивалась диатомовая водоросль *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen, отличаются лучшими вкусовыми качествами, а их коммерческая стоимость повышается. Известно, что окрашивание на плантациях по выращиванию устриц происходит сезонно и нерегулярно, и до сих пор до конца неясно, чем определяется всплеск численности *H. ostrearia*. В Черном море в местах выращивания моллюсков регулярно встречается *H. karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget [8]. Этот вид, по-видимому, является эндемиком Черного моря, поскольку в других местах

Мирового океана не отмечался. Сравнительно недавнее описание этого вида [9] положило начало изучению разнообразия мареннин-продуцирующих представителей рода *Haslea*.

В свое время проводились опыты по окрашиванию устриц в искусственных условиях [10]. Все более очевидной становится необходимость использования в качестве продуцентов мареннина высокопродуктивных штаммов, для получения которых могут быть задействованы методы селекции и генной инженерии. В литературе представлены теоретические основы и обсуждается перспектива применения методов классической селекции в отношении диатомовых [11–13]. Следует, однако, подчеркнуть, что диатомовые водоросли отличаются значительным разнообразием и индивидуальными особенностями репродуктивной биологии. Применительно к роду *Haslea* заключение о возможности проведения селекции отсутствует. Задача настоящей работы состоит в обсуждении постулатов репродуктивной биологии, актуальных для селекции представителей рода *Haslea* – продуцентов мареннин-подобных пигментов.

Мареннин-подобный пигмент у видов рода *Haslea*

Мареннин и мареннин-подобные пигменты – это пигменты, синтезируемые некоторыми представителями рода *Haslea*, в частности, *H. ostrearia*, *H. karadagensis*, *H. silbo* Gastineau, Hansen & Mouget, *H. provincialis* Gastineau, Hansen & Mouget, *H. nusantara* Mouget, Gastineau & Syakti. Стоит отметить, что все эти пигменты относятся к одной группе – мареннины. Мареннином принято называть пигмент, синтезируемый видом *H. ostrearia*, из-за того, что именно у этой диатомовой он был впервые найден и описан. Пигменты остальных мареннин-продуцирующих видов рода *Haslea* называют мареннин-подобными. Хотя мареннины являются водорастворимыми, термин красители к ним не применяется.

Химическая природа и структура молекулы пигмента до конца не выяснена [14]. Противовирусная и антибактериальная активность мареннина по сведениям из литературных источников объясняется нахождением в его структуре β-глюкана [4, 10, 15–17]. В фотосинтезе мареннин участия не принимает, предполагается его фотопротекторная роль [18]. В цитоплазме пигмент распределен диффузно, концентрируясь у концов клетки. Мареннин и мареннин-подобные пигменты существуют в двух формах: внутриклеточной (IMn, intracellular marennine) и внеклеточной (EMn, extracellular marennine) [19]. Жабры устриц, питавшихся *H. ostrearia*, окрашиваются в голубовато-зеленый цвет, а если в рационе присутствовал *H. karadagensis*, ткани приобретают зеленовато-серый оттенок [20]. Оптические спектры пигментов, синтезируемых представителями рода *Haslea*, различны [5, 21].

Жизненный цикл и репродуктивная система диатомей рода *Haslea*

Основными методами классической селекции являются отбор и гибридизация. Если в отношении отбора существенных препятствий в случае диатомовых водорослей не возникает – в природе они представлены огромным количеством клонов, то гибридизация возможна только при наличии полового воспроизведения. Особенностью диатомовых водорослей является диплонтический жизненный цикл [12, 22]. Основную часть жизненного цикла они проводят в диплоидном состоянии, гаплоидными являются короткоживущие гаметы.

Ввиду особенностей строения клетки диатомей в процессе вегетативного деления уменьшаются в размерах. Достигнув критического размера, называемого кардинальным пунктом [23], они переходят в генеративную фазу жизненного цикла. Находясь в генеративной фазе, при благоприятных условиях, а также при наличии полового партнера клетки могут вступить в процесс полового воспроизведения с последующим образованием специализированной клетки – ауксоспоры. Ауксоспоры способны за несколько часов увеличиться до видохарактерного размера, тем самым восстанавливая максимальный размер клеток в популяции. Следует подчеркнуть, что у подавляющего большинства диатомовых водорослей, в том числе и у *Haslea*, в соответствии с принципом уменьшения и восстановления исходных размеров клеток, называемым правилом Макдональда–Пфитцера [24], половое воспроизведение является необходимым этапом жизненного цикла.

К настоящему времени описаны схемы полового процесса у шести представителей *Haslea*: *H. crucigera* (W. Smith) Simonsen [25], *H. ostrearia* [26, 27], *H. subagnita* (Proshkina-Lavrenko) Makarova & Karayeva [28, 29], *H. karadagensis* [30], *H. provincialis* [21], *H. silbo* [31]. Системы скрещивания у всех изученных видов *Haslea*, включая не продуцирующую мареннин *H. subagnita*, похожи. Представители рода *Haslea*, как и большинство изученных диатомовых группы пеннатных [32], являются разнополюсными организмами. Они имеют два пути полового воспроизведения: гомоталлический и гетероталлический. Базовым является гетероталлический путь, в то время как гомоталлическое воспроизведение происходит редко и случайно [33].

При проведении классической селекции пеннатных диатомовых раздельнополость особей и генотипическая детерминация пола являются определенным преимуществом, позволяющим проводить скрещивание разных штаммов с заданным полом, не изменяющимся на протяжении всей жизни, в отличие от центрических диатомей, у которых пол контролируется эпигенетически [34]. Раздельнополость сама по себе подразуме-

вает гетерогенность особей и, более того, может обуславливать наследование признаков по полу. В настоящее время нет данных, свидетельствующих о зависимости продукции мареннина от половой принадлежности. При этом, например, известно, что наследование митохондрий у *H. ostrearia* осуществляется по линии одного пола [35].

Важное место в селекции организмов занимает получение чистых линий. Добившись генетической гомозиготности, можно осуществить скрещивание чистых линий для получения эффекта гетерозиса. При этом надо помнить о низкой жизнеспособности и плодовитости инбредного потомства [12].

Теоретически можно допустить образование полиплоидных гибридов, учитывая способность некоторых пеннатных диатомовых [36–38], в том числе *H. provincialis* [21], к формированию триплоидных ауксоспор.

Практические рекомендации для проведения селекции видов рода *Haslea*

В традиционной селекции выделяют массовый, индивидуальный (клоновый) отбор и отбор по чистой линии [39]. Массовый отбор представляет собой отбор и выделение очень большого количества особей (штаммов) с последующим отсеиванием наименее продуктивного материала. В нашем случае возникает проблема из-за того, что в природе вид представлен огромным количеством клонов, из которых в процессе практической работы можно выделить лишь небольшую часть. Такой отбор будет очень трудоемок из-за необходимости выделения сотен клонов и выявления наиболее продуктивных штаммов. В отношении диатомовых такой отбор не подходит.

Применение понятий индивидуального и клонового отборов нуждается в уточнении, когда речь идет о микроорганизмах, отдельные генетические линии которых представлены диффузно распределенными генетически идентичными клетками. С точки зрения генетики эти понятия эквивалентны. Нет единого мнения в отношении употребле-

ния терминов «клон» и «штамм». Мы рассматриваем клон как все потомство одной исходной клетки (у диатомовых это инициальная клетка), полученное в процессе вегетативного (митотического) деления. Штамм — это лабораторная культура, представляющая собой часть клона.

Благодаря генетической однородности ценным материалом при проведении классической селекции служат чистые линии. Как известно, наследование количественных признаков подчиняется второму закону расщепления, однако анализ наследования таких признаков значительно затруднен [40]. На сегодняшний день нет информации о передаче в поколениях такого количественного признака, как продуктивность в отношении синтеза мареннина и мареннин-подобных пигментов.

После первоначального отбора наиболее продуктивных клонов следующим этапом выступает гибридизация. Для гибридизации важным фактором является гетерогенность особей (клонов). В случае *Haslea* — гетерогенность по признаку интенсивности синтеза мареннина. По нашим наблюдениям, при одинаковых условиях содержания, клоновые культуры *H. karadagensis* заметно отличаются по интенсивности окрашивания внеклеточным мареннин-подобным пигментом (рисунок).

Таким образом, представители рода *Haslea* обладают всеми необходимыми репродуктивными особенностями, позволяющими осуществить классическую селекцию (табл. 1).

Разобрав теоретическую часть проведения селекции рода *Haslea*, стоит дать ряд практических рекомендаций. Из природной популяции следует выделить необходимое для формирования репродуктивно совместимых пар количество штаммов. Из них отбираются наилучшие продуценты мареннина. В интересующих штаммах измеряют апикальную длину клеток для определения их готовности к половому воспроизведению. Для мареннин-продуцирующих представителей рода *Haslea* границы перехода из вегетативной фазы в генеративную фазу жизненного цикла установлены экспериментально (табл. 2).



Рисунок. Вариабельность интенсивности окрашивания среды внеклеточным мареннин-подобным пигментом у разных клонов *Haslea karadagensis* при одинаковых условиях содержания и равной начальной концентрации клеток в культурах.

Таблица 1

Свойства представителей рода *Haslea*, обуславливающие возможность проведения классической селекции

Искусственный отбор		Гибридизация	
Массовый	Индивидуальный	Аутбридинг	Инбридинг
Подразумевает выбраковку непродуктивных особей (штаммов). Благодаря огромному генетическому разнообразию, носителями которого выступают отдельные клоны, этот метод осуществим, но крайне трудоемок из-за необходимости выделения сотен штаммов для его осуществления.	Отбор наиболее перспективных в отношении интересующих признаков штаммов для проведения гибридизации и получения потомков следующего поколения. Этот метод пригоден для объекта нашего исследования, так как не требует большого количества штаммов.	Представителям рода <i>Haslea</i> свойственна раздельнополость, и половое воспроизведение является облигатным этапом их жизненного цикла. Гаметогенез и ауксоспоруляция у видов этого рода при благоприятных условиях достаточно интенсивны, что позволяет получить необходимое количество потомков. Ввиду преобладания гетероталлизма в системе скрещивания осуществление аутбридинга не вызывает затруднений.	Для проведения инбредной гибридизации потребуются скрещивание клонов, являющихся потомками одной родительской пары клонов, или сестринских клеток — потомков одной гаметангиальной пары. В результате инбридинга потомки ослабевают и в большинстве случаев не дают потомства.

Таблица 2

Максимальная длина клеток и границы перехода из вегетативной в генеративную фазу жизненного цикла (кардинальный пункт) у представителей рода *Haslea* — продуцентов маренина

Вид	Максимальный видоспецифический размер, мкм	Кардинальный пункт, мкм	Источник
<i>Haslea karadagensis</i>	97	52	[30]
<i>Haslea ostrearia</i>	143	68	[30]
<i>Haslea silbo</i>	138	75	[31]
<i>Haslea provincialis</i>	114	50	[21]

В экспериментах по скрещиванию целесообразно использовать пары штаммов, различающихся размерами клеток, чтобы быть уверенными, что в смешанных посевах происходит гетероталлическое воспроизведение. Ускорить достижение генеративной фазы можно, регулируя световой режим (продолжительность фотопериода и интенсивность освещения), температуру и соленость.

Как было показано для *H. karadagensis*, вступлению в половой процесс благоприятствуют повышение солености (вплоть до уровня, вдвое превышающего привычный для данного вида [30]) и световой период 8–12 ч при умеренной освещенности. У близкородственного вида *H. ostrearia* наибольшую интенсивность полового воспроизведения наблюдали при 8-часовом фотопериоде и интенсивности света 60 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ [41]. Помимо подходящей среды для культивирования и необходимых условий содержания, для осуществления успешного скрещивания важно использовать культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста [24].

Наличие генеративной фазы в жизненном цикле диатомовых имеет свои положительные и отрицательные стороны. С одной стороны, для проведения селекции штаммы необходимо содержать в культуре до достижения клетками критических размеров. С другой стороны, это дает возможность сохранить штамм — генетическую линию — растянув вегетативную фазу, обеспечив необходимые для этого пониженную температуру и сумеречные условия освещенности.

Таким образом, благодаря своим репродуктивным особенностям, виды *Haslea* потенциально могут выступать объектами для селекционных работ, обладая такими ключевыми признаками, как раздельнополость и гетероталлический путь воспроизведения. Остается неизвестным механизм наследования признака продуктивности клетки по маренину. До настоящего времени никто не занимался селекцией диатомовых, включая представителей рода *Haslea*, синтезирующих пигмент, обладающий рядом ценных качеств, хотя для этого имеются все предпосылки с точки зрения репродуктивной биологии.

Работа выполнена в рамках государственного задания (проект №121032300019-0) Карадагской научной станции имени Т.И. Вяземского — природного заповедника РАН — филиала Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» «Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов». В работе были использованы материалы Научно-образовательного центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского» «Коллекция диатомовых водорослей Мирового океана». Работа выполнена без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ward O.P., Singh A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* 2005;40(12):3627–3652.
2. Patil V., Kallqvist T., Olsen E., Vogt G., Gislerød H.R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquac. Int.* 2007;15:1–9.
3. Gastineau R., Davidovich N.A., Hansen G. *Haslea ostrearia*-like Diatoms: Biodiversity out of the Blue. *Advances in Botanical Research*, vol. 71. Ed. N. Bourgougnon. Academic Press; 2014:441–465.
4. Pouvreau J.-B., Morancas M., Taran E., Rosa P., Dufosse L., Guerard F., Pin S., Fleurence J., Pondaven P. Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenolic pigment from the diatom *Haslea ostrearia* responsible for the natural greening of cultured oysters. *J. Agr. Food. Chem.* 2008;56(15):6278–6286.
5. Gastineau R., Turcotte F., Pouvreau J.-B. Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex. *Mar. Drugs.* 2014;12(6):3161–3189.
6. Sprat T. *History of the Royal Society*. London: J. Martyn; 1667. 438 pp.
7. Lankester E.R. On green oysters. *J. Cell Sci.* 1885;26(101):71–94.
8. Давидович О.И., Давидович Н.А. Диатомовая водоросль *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget за пределами Карадагского заповедника. Сборник тезисов II Всероссийской научно-практической школы-конференции «Наземные и морские экосистемы Причерноморья и их охрана» 28 сентября – 02 октября 2020 года г.п.т Курортное, Феодосия, Республика Крым, ЮФО. 2020:58–60.
9. Gastineau R., Davidovich N.A., Bardeau J.-F., Caruso A., Leignel V., Hardivillier Y., Jacqueline B., Davidovich O.I., Rincé Y., Gaudin P., Cox E.J., Mouget J.-L. *Haslea karadagensis* (Bacillariophyta): a second blue diatom, recorded from the Black Sea and producing a novel blue pigment. *Eur. J. Phycol.* 2012;47(4):469–479.
10. Gastineau R., Pouvreau J.-B., Hellio C., Morancas M., Fleurence J., Gaudin P., Bourgougnon N., Mouget J.-L. Biological activities of purified marennine, the blue pigment produced by the diatom *Haslea ostrearia* and responsible for the greening of oysters. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60(14):3599–3605.
11. Chepurnov V.A., Mann D.G., Dassow P., Vanormelingen P., Gillard J., Inzé D., Sabbe K., Vyverman W. In search of new tractable diatoms for experimental biology. *BioEssays*. 2008;30(7):692–702.
12. Chepurnov V.A., Chaerle P., Roef L., van Meirhaeghe A., Vanhoutte K. Classical breeding in diatoms: scientific background and practical perspectives. *The Diatom World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol. 19(2). Eds. J. Seckbach and J.P. Kociolek. Sleidinge: Springer; 2011:171–194.
13. Chepurnov V.A., Chaerle P., Vanhoutte K., Mann D.G. How to breed diatoms: examination of two species with contrasting reproductive biology. *The Science of Algal Fuels: Phycology, Geology, Biophotonics, Genomics and Nanotechnology*, vol. 25. Eds. R. Gordon and J. Seckbach. Springer; 2012:323–340.
14. Zebiri I., Jacqueline B., Francezon N., Herbaut M., Latigui A., Bricaud S., Tremblay R., Pasetto P., Mouget J.-L., Dittmer J. The polysaccharidic nature of the skeleton of marennine as determined by NMR spectroscopy. *Mar. Drugs.* 2023;21(1):42.
15. Yusuf M., Baroroh U., Nuwarda R.F., Prasetya F.S., Ishmayana S., Novianti M.T., Tohari T.R., Hardianto A. Subroto T., Mouget J.-L., Pasetto P. Theoretical and experimental studies on the evidence of 1,3-β-glucan in marennine of *Haslea ostrearia*. *Molecules.* 2023;28(15):5625.
16. Falaise C., Francois C., Travers M.-A. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Mar. Drugs.* 2016;14(9):159.
17. Turcotte F., Mouget J.-L., Genard B., Lemarchand K., Deschênes J.S., Tremblay R. Prophylactic effect of *Haslea ostrearia* supernatant culture containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production. *Aquat. Living Resour.* 2016;29(4):401.
18. Schubert H., Tremblin G., Robert J.-M., Sagert S., Rincé Y. *In-vivo* fluorescence measurement of photosynthesis of *Haslea ostrearia* Simonsen in relation to marennine content. *Diatom Res.* 1995;10(2):341–349.
19. Pouvreau J.-B., Morancas M., Fleury F., Rosa F., Thion L., Cahingt B., Franck Zal F., Fleurence J., Pondaven P. Preliminary characterisation of the blue-green pigment “marennine” from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J. Appl. Phycol.* 2006;18(6):757–767.
20. Gastineau R., Hardivillier Y., Leignel V., Tekaya N., Morancas M., Fleurence J., Davidovich N.A., Jacqueline B., Gaudin P., Hellio C., Bourgougnon N., Mouget J.-L. Greening effect on oysters and biological activities of the blue pigments produced by the diatom *Haslea karadagensis* (Naviculaceae). *Aquac.* 2012;368–369:61–67.
21. Gastineau R., Hansen G., Davidovich N.A., Davidovich O.I., Bardeau J.-F., Kaczmarek I., Ehrman J.M., Leignel V., Hardivillier Y., Jacqueline B., Poulin M., Morancas M., Fleurence J., Mouget J.-L. A new blue-pigmented hasleoid diatom, *Haslea provincialis*, from the Mediterranean Sea. *Eur. J. Phycol.* 2016;51(2):156–170.
22. Gastineau R., Davidovich N.A., Hallegraeff G.M., Prober I., Mouget J.-L. Reproduction in Microalgae. *Reproduction in Microalgae*. Eds. K.G. Ramawat, J.M. Mérillon and K.R. Shivanna. Boca Raton: CRC Press; 2014:1–28.
23. Geitler L. Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen). *Arch. Protistenkd.* 1932;78(1):1–226.
24. Chepurnov V.A., Mann D.G., Sabbe K., Vyverman W. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology*, vol. 237. Ed. K.W. Jeon. Academic Press; 2004:91–154.
25. Karsten G. Untersuchungen über Diatomeen. *Flora oder Allgemeine botanische Zeitung*, vo. 83. Ed. K. Goebel. Marburg: Elwert'sche Verlag.; 1897:203–221.
26. Neuville D., Daste P. Premières observations sur la reproduction, par division binaire, de la diatomée *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory cultivée *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris Sér. I Math.* 1972;274:1083–1085.
27. Davidovich N.A., Mouget J.-L., Gaudin P. Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.* 2009;44(2):251–261.

28. Чепурнов В.А. Половой процесс у двудомной водоросли *Haslea subagnita* (Proshkina-Lavrenko) Makarova & Karayeva (Bacillariophyta). *Альгология*. 1993;3(4):37–40.
29. Рошин А.М. *Жизненные циклы диатомовых водорослей*. Киев: Наукова думка; 1994. 171 с.
30. Davidovich N.A., Gastineau R., Gaudin P., Davidovich O.I. Sexual reproduction in the newly-described blue diatom, *Haslea karadagensis*. *J. Czech Phycol. Soc.* 2012;12(2):219–229.
31. Gastineau R., Hansen G., Poulin M., et al. *Haslea silbo*, a novel cosmopolitan species of blue diatoms biology. *Biology*. 2021;10(4):328.
32. Давидович Н.А., Давидович О.И. *Репродуктивная биология диатомовых водорослей*. Симферополь: ИТ «АРИАЛ»; 2022. 194 с.
33. Davidovich N.A., Mouget J.-L., Gaudin P. Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.* 2009;44(2):251–261.
34. Davidovich N.A. Sexual heterogeneity of the clones of *Nitzschia longissima* (Bréb.) Ralfs (Bacillariophyta). *Int. J. Algae*. 2002;4(3):104–116.
35. Gastineau R., Leignel V., Jacqueline B., Hardivillier Y., Wulff A., Gaudin P., Bendahmane D., Davidovich N.A., Kaczmarek I., Mouget J.-L. Inheritance of mitochondrial DNA in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Naviculaceae) during auxosporulation suggests a uniparental transmission. *Protist*. 2013;164(3):340–351.
36. Chepurnov V.A., Mann D.G., Vyverman W., Sabbe K., Danielidis D.B. Sexual reproduction, mating system, and protoplast dynamics of *Seminavis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 2002;38(5):1004–1019.
37. Chepurnov V.A., Mann D.G., Sabbe K., Vannerum K., Casteleyn G., Verleyen E., Peperzak L., Vyverman W. Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.* 2005;40(4):379–395.
38. Pouličková A., Mayama S., Chepurnov V.A., Mann D.G. Heterothallic auxosporulation, incunabula and perizonium in *Pinnularia* (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol.* 2007;42(4):367–390.
39. Вавилов Н.И. *Теоретические основы селекции*. М.: Наука; 1987. 511 с.
40. Hartl D.L., Jones E.W. *Genetics: Principles and Analysis*. Jones and Bartlett Publishers; 1998. 1366 pp.
41. Mouget J.-L., Gastineau R., Davidovich O.I., Gaudin P., Davidovich N.A. Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea ostrearia*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009;69(2):194–201.

Поступила в редакцию 24.03.2023

После доработки 01.11.2023

Принята в печать 08.11.2023

REVIEW

Features of the reproductive biology of representatives of the genus *Haslea* Simonsen (Bacillariophyta), allowing the use of classical breeding methods

E.S. Kirienko* , N.A. Davidovich 

T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences – Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS,
24 Nauki st., Kurortnoye, Feodosia, Republic of Crimea, 298188, Russia

*e-mail: esk-00@bk.ru

The application of the classical selection of diatoms on the example of the genus *Haslea* is considered. The ability of some representatives of this genus to synthesize marennine and marennine-like pigments is interesting to researchers and owners of oyster farms because these unique pigments can colorise the tissues of mollusks in a greenish color and improve their organoleptic properties. It has been shown that marennine has antibacterial, antiviral, antioxidant and other biological activities. It is assumed that the efficiency of marennine biosynthesis can be increased by obtaining highly productive strains by selection, which was not previously carried out in diatoms. The assessment of the possibility and prospects of applying the methods of classical breeding in relation to representatives of the genus *Haslea* is given. It is shown that significant success has been achieved to date in the study of the life cycle, crossing systems and other features of the reproductive biology of representatives of the genus *Haslea*, which allows them to carry out classical selection by selection, hybridization and obtaining descendants of the next generation.

Keywords: *Haslea*, diatoms, classical breeding, marennine, aquaculture, heterotallism

Funding: The work was carried out within the framework of the state task of T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature reserve of the Russian Academy of Sciences – Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS “Study of fundamental physical, physiological and biochemical, reproductive, population and behavioral characteristics of marine hydrobionts,” project number 121032300019-0. The materials of the Scientific and Educational Center for Collective Use of FRC IBSS “Collection of diatoms of the World Ocean” were used in this work.

Сведения об авторах

Кириенко Екатерина Сергеевна — инженер лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел.: 8-36562-2-62-12; e-mail: esk-00@bk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-4110-8424>

Давидович Николай Александрович — докт. биол. наук, зав. лабораторией водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел.: 8-36562-2-62-12; e-mail: nickolaid@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3510-0453>



Взаимодействие нейротрансмиттеров с микроводорослями: концептуальные и практические аспекты

А.В. Олескин¹, * , Ц. Боян²

¹Кафедра общей экологии и гидробиологии биологического факультета Московского государственного университета, 119234, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, Россия;

²Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Китай, Провинция Гуандун, г. Шэньчжэнь, 518172, район Лунган, Даюньсиньчэн, ул. Гоцзидасюеюань, д. 1

*e-mail: oleskiny@yandex.ru

Нейротрансмиттеры (нейромедиаторы), помимо своих функций в нервной системе животных, функционируют как регуляторные и сигнальные агенты у представителей различных царств живого. Многие нейротрансмиттеры в низких концентрациях оказывают значительное воздействие на микроводоросли, во многих случаях выступая как стимуляторы роста их культур. Усиливая накопление биомассы микроводорослей и синтез ими липидов, углеводов и других ценных продуктов, нейромедиаторы представляют потенциальный интерес с биотехнологической точки зрения — в рамках проектов по получению «водорослевых» лекарств, пищевых добавок, а также биодизеля и других видов биотоплива. Будучи способными к синтезу нейротрансмиттеров и/или стимулируя их синтез микробиотой желудочно-кишечного тракта, некоторые виды микроводорослей могут способствовать физическому и психическому здоровью людей. Микроводоросли способны к нейропротекторному действию, и в то же время многие из них выделяют токсины, влияющие на деятельность нервной системы.

Ключевые слова: микроводоросли, биотехнология, нейротрансмиттеры, биогенные амины, серотонин, гистамин, дофамин, норадреналин, ось микробиота-кишечник-мозг

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-10

Нейротрансмиттеры (нейромедиаторы) можно определить как сигнальные молекулы, секретируемые нервными клетками (нейронами) для воздействия на другие нервные клетки, отделенные от них синаптическими щелями [1]. Нейротрансмиттеры подразделяют на несколько групп, из которых мы уделим особое внимание биогенным аминам, в том числе катехоламинам (дофамину, норадреналину), серотонину, гистамину, а также ацетилхолину. Многие нейротрансмиттеры выполняют коммуникативные и регуляторные функции у представителей различных типов животных, растений, грибов, простейших [2–4]. В недавнем обзоре [5] мы охарактеризовали нейротрансмиттеры как коммуникативные агенты, которые участвуют в регуляции функционирования целых экосистем (экомоны [5–7]).

В настоящей работе мы рассматриваем воздействие нейротрансмиттеров на важные компоненты водных экосистем — микроводоросли. Микроводоросли являются микроскопическими одноклеточными, колониальными или нитевидными представителями водорослей [8, 9] как «фи-

логенетически разнообразного ансамбля организмов в диапазоне от одноклеточного планктона до гигантских морских зарослей» ([10], с. 35). Микроводоросли обычно встречаются в пресноводных и морских экосистемах, обитая как в толще воды (в роли фитопланктона), так и в составе бентоса в осадочных породах [11]. Кроме того, водоросли часто встречаются в других типах водоемов (солоноводных, содовых озерах и т.п.), а также в почвах и являются их важными компонентами.

1. Роль нейротрансмиттеров у микроводорослей

В данном разделе рассмотрим современное состояние знаний о влиянии добавляемых в эксперименте к культурам микроводорослей нейротрансмиттеров. Помимо этого, мы уделим внимание пока еще фрагментарным литературным сведениям о биосинтезе нейротрансмиттеров [10, 12] самими клетками микроводорослей (таблица). Несмотря на то, что настоящий обзор посвящен микроводорослям, в отдельных пунктах в целях сопоставления будут кратко даны и сведения о некоторых макроскопических водорослях.

Таблица

Эндогенные и экзогенные нейротрансмиттеры у микроводорослей

Нейротрансмиттер	Действие на микроводоросли или эндогенный синтез
Дофамин	1. Ускорение роста в низких концентрациях у <i>Chlorella vulgaris</i> и <i>Scenedesmus quadricauda</i> [38, 39] 2. Синтез микроводорослью <i>Ulnaria ulna</i> [36]
Норадреналин	Небольшая стимуляция роста в низких концентрациях у <i>C. vulgaris</i> и <i>S. quadricauda</i> [38, 39]
Серотонин	1. Существенная стимуляция роста в низких концентрациях у <i>C. vulgaris</i> и <i>S. quadricauda</i> [38, 39] 2. Синтез микроводорослью <i>Ulnaria ulna</i> [36]
Гистамин	1. Весьма значительная (двукратная) стимуляция роста в низких концентрациях у <i>C. vulgaris</i> и <i>S. quadricauda</i> [38, 39] 2. Синтез микроводорослью <i>Ulnaria ulna</i> [36].
Ацетилхолин	1. Существенная стимуляция роста у <i>C. vulgaris</i> [29] и других видов <i>Chlorella</i> [28]; стимуляция накопления моносахаридов и водорастворимых белков у <i>C. vulgaris</i> [29]; усиление синтеза липидов у <i>Chlorella</i> spp. [28] 2. Светозависимый синтез микроводорослью <i>Micrasterius denticulata</i> [26, 27]
Таурин	Умеренная стимуляция роста у <i>Chlorella</i> spp. [29]

1.1. Ацетилхолин. Ацетилхолин (химическая формула приведена на рис. 1) исторически был первым изученным нейротрансмиттером. В 1914 г. Артур Дж. Юинс идентифицировал его в экстрактах спорыньи *Claviceps purpurea*. В том же году Генри Дейл описал воздействие ацетилхолина на различные типы периферических синапсов [13]. В 1921 г. Отто Леви установил, что блуждающий нерв выделяет вещество, которое подавляет работу сердечной мышцы [14]. В 1926 г. О. Леви и Э. Навратиль идентифицировали это вещество как ацетилхолин [15]. Более поздние исследования подтвердили функцию ацетилхолина как нейромедиатора [16]. Действие ацетилхолина в нервной системе животных обусловлено его связыванием с рецепторами двух типов – никотиновыми (nAChR-рецепторы, отвечают за зависимость от никотина в табаке) и мускариновыми (связывающийся с ними мускарин содержится в мухоморе *Amanita muscari*) [1].

Ацетилхолин синтезируется различными микроорганизмами – в частности, представителями родов *Bacillus* и *Lactobacillus* [17, 18]. Что касается одноклеточных эукариот, то имеются данные об его синтезе простейшим *Acanthamoeba* sp. [19].

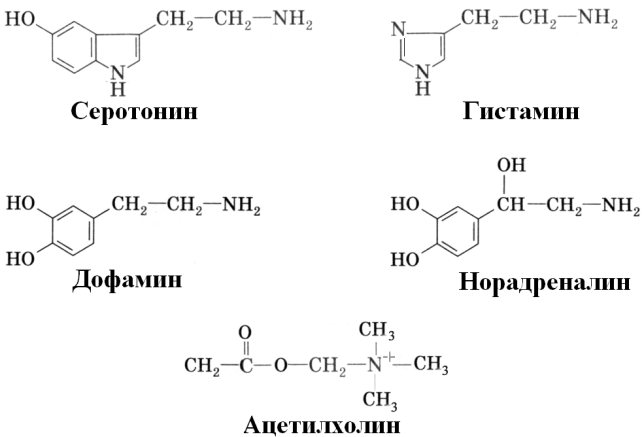


Рис 1. Формулы ключевых нейромедиаторов

Ацетилхолин содержат ткани по крайней мере 65 видов цветковых растений, относящихся к 33 различным семействам: много ацетилхолина содержится в жгучих волосках крапивы [8]. У *Arabidopsis thaliana* (резушка Таля) ацетилхолин в высоких концентрациях характерен для семян и корней [20]. Макроводоросли *Sargassum tenerimum* [21] и *Laurencia obtusata* [22] также содержат ацетилхолин.

Предшественниками ацетилхолина в растениях, как и у животных, является ацетил-коэнзим А и холин. Высказана гипотеза, что холин использовался одноклеточными организмами более миллиарда лет тому назад для синтеза мембранных фосфолипидов [23]. Далее холин был включен в иные метаболические пути, в том числе стал «сырьем» для синтеза ацетилхолина.

Ключевой фермент синтеза ацетилхолина – ацетилтрансфераза – был обнаружен, кроме высших растений, также у цианобактерий [24], у некоторых из которых (представители рода *Oscillatoria*) выявлен и сам ацетилхолин [25].

Micrasterias denticulata, одноклеточная зеленая водоросль порядка десмидиевых, способна к светозависимому продуцированию ацетилхолина, согласно данным, полученным с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрией [26, 27]. Вещества, связывающие рецепторы к ацетилхолину (карбахол и никотин) или выводящие эти рецепторы из строя (тубокуринхлорид и бензосульфат гексаметония), подавляют процессы роста и вызывают серьезные изменения морфологии клеток данной микроводоросли, если их добавлять на ранних стадиях культивирования микроводоросли. Так, никотин подавляет образование вторичной клеточной стенки. Эти данные дают основания предполагать наличие у *Micrasterias* холинергических рецепторов, участвующих в росте и индуцированной светом дифференцировке [26, 27].

Предшественник ацетилхолина холин обнаружен в количестве 0,001–0,32% от сухого веса некоторых видов микроводорослей, относящихся к Chlorophyta, Rhodophyta, Phaeophyta, Euglenophyta [28].

Ацетилхолин стимулирует рост зеленых микроводорослей рода *Chlorella* в концентрациях от примерно 0,1 мкМ [28] до 10–100 мкМ [29], способствует накоплению в их клетках липидов, в том числе ненасыщенных, в особенности – содержащих биотехнологически ценную¹ α-линоленовую кислоту [28]. Для сопоставления отметим, что в нервной системе животных присутствуют наномолярные концентрации ацетилхолина (например, в головном мозге домашней мыши *Mus musculus* обнаружено порядка 10 наномолей/кг ацетилхолина [30]). Для растений характерны более высокие концентрации ацетилхолина – например, в различных органах фасоли содержится от 0,7–7,4 (стебли) до 21–53 (листья) микромоля на 1 кг сырой биомассы [25].

Ацетилхолин повышает у хлореллы концентрацию хлорофиллов *a* и *b*, моносахаридов, кобаламина (витамина B₁₂) [29]. Холин, непосредственный предшественник ацетилхолина, а также его производные, стимулируют рост хлореллы и накопление липидов в ее биомассе, хотя и в более высоких концентрациях, чем ацетилхолин [28]. Стимулирующее действие на рост, синтез хлорофиллов и углеводных компонентов у *C. vulgaris* оказывает химически сходный с ацетилхолином серосодержащий нейротрансмиттер таурин [29].

Показано стимулирующее действие ацетилхолина также на рост микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (неопубликованные данные авторов настоящего обзора). Механизм действия ацетилхолина в случае микроводорослей нуждается в дальнейших исследованиях с целью поиска связывающих ацетилхолин рецепторов.

Наряду с микроводорослями уместно здесь остановиться – для сравнения – на данных последних лет по макроводорослям, а именно харовитам (харовым водорослям). Нитчатые харовиты напоминают нервные клетки животных, так как способны к проведению электрических импульсов, хотя и в 1000 раз более медленному, чем у нейронов [10, 31].

Добавление в среду ацетилхолина приводит к тому, что у клеток харовых водорослей *Chara corallina* усиливается активность хлоридных трансмембранных каналов, что обуславливает деполяризацию мембран и, тем самым, формирование распространяющегося по нитям клеток водорослей потенциала действия [10].

У харовита *C. corallina* никотин усиливает деполяризующее мембраны действие ацетилхолина.

Эти данные послужили основанием для предположения о наличии на мембранах харовита рецепторов, связывающих ацетилхолин и функционально аналогичных никотиновым рецепторам [10].

Однако данные недавней работы с водорослью *Chara braunii* говорят о том, что ацетилхолин не связывается с рецепторами, а расщепляется под действием фермента ацетилхолинэстеразы. Получаются холин, ацетат и ионы водорода, которые и обуславливают наблюдаемую при добавлении ацетилхолина деполяризацию мембран водорослей [32].

Вопрос, который предстоит рассмотреть в дальнейших исследованиях, заключается в том, участвует ли ацетилхолин в передаче электрических импульсов у нитчатых микроводорослей. Известно, что многие одноклеточные организмы содержат специфичные для животных клетки пути синтеза ацетилхолина [19]. Мы полагаем, что следует выполнить эксперименты для выяснения вопроса о воздействии ацетилхолина на формирование мембранного потенциала также у микроводорослей. Поскольку в микроводоросли, в отличие от нитчатых харовитов, технически проблематично ввести электрод, можно регистрировать мембранный потенциал клеток, например, клеток хлореллы, по концентрации проникающих через мембраны ионов (в частности, тетрафенилфосфония) по разработанной под руководством В.П. Скулачева [33] методике.

1.2. Серотонин. Серотонин (5-гидрокситриптами́н, химическая формула приведена на рис. 1) совмещает в организме животных нейротрансмиттерную функцию с ролью локально действующего тканевого гормона (гистогормона), участвующего в регуляции воспалительных процессов наряду с гистамином (ниже). Более 90% общего пула серотонина в организме человека синтезируется в пищеварительном тракте в результате метаболизации триптофана, поступающего в организм с пищевыми продуктами [1].

Серотонин у животных, включая человека, синтезируется из аминокислоты L-триптофана коротким метаболическим путем. Процесс катализируется двумя ферментами: триптофангидроксилазой (tryptophan hydroxylase, TPH), катализирующей синтез 5-гидрокситриптофана, и декарбоксилазой ароматических аминокислот (aromatic acid decarboxylase, AAD). Однако в растительных (в том числе водорослевых) клетках имеется альтернативный путь «триптофан => триптамин => серотонин» [34]. Серотонин метаболизируется у животных с помощью моноаминоксидаз, превращаясь в 5-гидроксииндолилуксусную кислоту, близкую по химической структуре к ауксину, гормону роста растений.

Серотонин содержится в 37 видах растений из 17 семейств. Концентрации серотонина особенно велики у представителей семейств Juglandaceae, Leguminosae (Fabaceae), Lygophyllaceae. Серото-

¹ α-линоленовая кислота входит в состав липидов, используемых в фармацевтике, а также при производстве топлива (биодизеля).

нин, который содержится в жгучих волосках крапивы или бархатных бобов *Mucuna pruriens*, способствует защите этих растений от поедания животными [35].

Гистохимические исследования выявили присутствие эндогенного серотонина в клетках диатомовой микроводоросли *Ulnaria ulna*. Предположительно, серотонин участвует в реакции этой микроводоросли на стресс [36], причем наиболее вероятно антиоксидантное действие серотонина или продукта его ацетилирования и метилирования — мелатонина. Серотонин, отметим для сопоставления, обнаружен также у макроводоросли — харофита *Chara australis* [37]. Он не обнаружен нами у *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda* методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором [38].

В нашей лаборатории [38, 39] получены данные о действии добавленного серотонина на рост зеленых микроводорослей, который регистрировали подсчетом клеток в полях зрения микроскопа и по величине оптической плотности культуры. Серотонин не вызывал статистически достоверной стимуляции роста *C. vulgaris* при самой низкой тестируемой концентрации, 1 мкМ. Однако более высокая концентрация серотонина, 10 мкМ, приводила к заметному рост-стимулирующему действию. Дальнейшее повышение концентрации ослабляло это действие, и самая высокая тестируемая концентрация серотонина (100 мкМ) вовсе не стимулировала рост *C. vulgaris*. При этой максимальной концентрации серотонина наблюдали выпадение в осадок значительной части биомассы водоросли, что указывало на токсическое действие серотонина [39].

Серотонин в концентрациях 1 и 10 мкМ вызывал примерно 30%-ную стимуляцию роста другой зеленой микроводоросли — *Scenedesmus quadricauda*. Как и в случае *C. vulgaris*, серотонин в концентрации 100 мкМ не вызывал стимуляции роста *S. quadricauda* [38].

Представленные здесь данные о снижении стимулирующего действия серотонина при повышении его концентрации можно объяснить, постулируя его двойственное влияние. При низких концентрациях (1–10 мкМ) наблюдаемая стимуляция роста микроводорослей может отражать специфическое действие серотонина, предположительно опосредованное его связыванием специфическими рецепторами. Подобные рецепторы обнаружены в бактериальных системах quorum sensing (QS). Такие системы отвечают за плотностно-зависимую коммуникацию у бактерий: сигналы quorum sensing при определенной пороговой плотности бактериальной популяции достигают достаточной концентрации для связывания с рецепторами и активации (или иногда репрессии) промоторов тех или иных оперонов — например, отвечающих за синтез антибиотиков

или образование биопленок (см. некоторые обзорные монографии [40, 41]). У синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* серотонин выступает в роли сигнала в quorum sensing-системе *lasI-lasR*. Повышение его концентрации ведет к усилению вирулентности и стимуляции образования биопленок *P. aeruginosa* как *in vitro*, так и *in vivo* — в организме инфицированной мыши [42].

При сравнительно высоких концентрациях серотонина (100 мкМ) отмечается его ингибирующее действие. Серотонин в таких концентрациях, по-видимому, может функционировать как разобщитель. Действительно, снижение мембранного потенциала под действием высоких концентраций серотонина было продемонстрировано на примере фотосинтетических мембран пурпурной фототрофной бактерии *Rhodospirillum rubrum* [43].

Что касается специфического — возможно, рецептор-зависимого — действия серотонина (наблюдавшегося в более низких его концентрациях), то здесь мы вновь привлечем к обсуждению данные литературы по харовым водорослям. Воздействие серотонина на их клетки рассматривается с позиций: 1) борьбы с окислительным стрессом, ибо серотонин является предшественником сильного антиоксиданта мелатонина; 2) создания и поддержания циркадных ритмов в биосистемах. В клетках харовой водоросли *Chara australis* наблюдали суточные колебания концентраций серотонина, причем ритм колебаний уровней как серотонина, так и мелатонина различался в условиях длинного (12 ч свет: 12 ч темнота) и короткого (9 ч свет: 15 ч темнота) дня [10].

1.3. Гистамин. Гистамин (химическая формула приведена на рис. 1) в организме млекопитающих многофункционален: он сочетает функции нейромедиатора и гистогормона, фактора местного воспаления (при котором выделяется и серотонин).

Гистамин синтезируется путем декарбоксилирования аминокислоты гистидина в реакции, катализируемой ферментом L-гистидиндекарбоксилазой (рис. 2) и метаболизируется с участием гистамин-N-метилтрансферазы или диаминоксидазы [1].

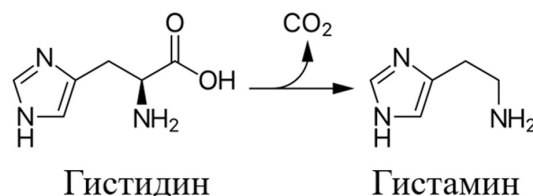


Рис. 2. Биосинтез гистамина

Гистамин накапливается в тканях многих растений. Его много в жгучих волосках крапивы и ряда других растений; предполагается экологическая роль гистамина как защитного фактора (наряду с серотонином, см. выше): под воздействием гистамина у поедающих растения животных

возникают ожоги, болевой синдром, аллергические реакции. Жгучий перец содержит до 74,51 мг гистамина на 1 кг биомассы. Стресс приводит к повышению концентрации гистамина в тканях растений [44]. Гистамин обнаружен гистохимически в препаратах клеток диатомовой микроводоросли *Ulnaria ulna* [36].

Действие гистамина на рост микроводорослей аналогично таковому серотонина, но отличается большей амплитудой рост-стимулирующего действия. У *C. vulgaris* гистамин в концентрациях 1 и 10 мкМ вызывал, соответственно, 65%-ную и 100%-ную стимуляцию роста культуры этой микроводоросли. Повышение концентрации гистамина до 100 мкМ оказывало ингибирующее влияние: количество клеток *C. vulgaris* оказывалось существенно меньше, чем в контрольной культуре (без добавки гистамина) [39]. У *S. quadricauda* действие гистамина было несколько менее выраженными и соответствовало 37,5%-ной и 65%-ной стимуляции роста при добавлении 1 и 10 мкМ гистамина. При 100 мкМ гистамина, в отличие от *C. vulgaris*, в культуре *S. quadricauda* наблюдали не ингибирование роста, а лишь ослабление стимулирующего влияния на ее рост [38].

Подобно серотонину, в отношении гистамина можно предположить наличие двух механизмов действия: 1) специфического (возможно, зависящего от рецепторов) при низких концентрациях; по аналогии с опухолевыми клетками (у которых гистамин стимулирует пролиферацию [45]) и 2) неспецифического, предположительно связанного с разобщающим действием на биомембраны, при более высоких концентрациях.

Литературные сведения в основном ограничены констатацией факта широкой распространенности гистамина в мире водорослей; концентрация этого нейротрансмиттера сильно варьирует в разных частях таллома макроводорослей и зависит от стадии их жизненного цикла. Так, у красной водоросли *Furcellaria lumbricalis* содержится значительно больше гистамина в мужских гаметофитах, нежели в женских гаметофитах и бесполой стадии (тетраспорофите) [10]. Можно предположить защитную роль гистамина как токсичного для многих водных животных вещества, что может предотвращать поедание водорослей зоопланктоном. Как уже упоминалось, гистамин обнаружен гистохимически в препаратах клеток диатомовой микроводоросли *Ulnaria ulna* [36].

1.4. Дофамин. Дофамин относится к числу катехоламинов, включающих также норадреналин и адреналин (формулы дофамина и норадреналина даны на рис. 1). Синтез и метаболизм катехоламинов осуществляются по основной схеме [1, 35], показанной на рис. 3; катехоламины образуются из аминокислоты тирозина с участием декарбоксилазы; их метаболизм катализируется моноаминоксидазами [1, 34, 40, 41].

Тирозин → ДОФА → Дофамин → Норадреналин

↓
ДОФУК → Гомованилиновая кислота

Рис. 3. Биосинтез и метаболизм катехоламинов. ДОФА, 2,3-дигидроксифенилаланин; ДОФУК, 2,3-дигидроксифенилуксусная кислота. Примечание: на рисунке не указаны продукты окисления норадреналина.

Катехоламины обнаружены у 28 видов из 18 протестированных семейств растений [8]. Характерно присутствие дофамина в цветах и плодах многих растений — в частности, в соцветиях ароидных (Araceae) и в мякоти плодов бананов [8, 46].

Этот нейротрансмиттер недавно обнаружен в клетках микроводоросли *Ulnaria ulna* [36]. В порядке сравнения: дофамин вырабатывается зеленой макроводорослью *Ulvaria obscura*, у которой он служит средством защиты от поедания морскими животными [10, 31].

Дофамин не был обнаружен методом ВЭЖХ с амперометрической детекцией в биомассе и культуральной жидкости *C. vulgaris* и *S. quadricauda* [38]. В экспериментах с *C. vulgaris* дофамин в концентрациях 1 и 10 мкМ существенно (примерно на 50% по сравнению с контролем) увеличивал количество клеток в растущей 1-суточной культуре, однако прибавка роста становилась менее выраженной при дальнейшем культивировании, т.е. речь шла об ускорении роста без существенного увеличения количества биомассы к концу культивирования. Ускоряющее действие не наблюдали при более высокой концентрации дофамина (100 мкМ), и по аналогии с другими испытанными нейротрансмиттерами можно предположить возникновение ингибиторного действия при повышении концентрации добавленного дофамина [39]. Ингибиторное действие предположительно связано с разобщающим влиянием дофамина на биомембраны.

В отличие от *C. vulgaris*, дофамин не только ускорял, но и вызывал повышение уровня накопления биомассы микроводоросли *S. quadricauda*: к концу периода культивирования культуры этой микроводоросли содержали в среднем на 36% (с 1 мкМ дофамина) и на 45% (с 10 мкМ дофамина) больше клеток, чем в контрольной культуре. Как и в случае *C. vulgaris*, рост *S. quadricauda* не стимулировался добавлением дофамина в высокой концентрации (100 мкМ) [38].

Подобно ситуации с гистамином, в отношении дофамина можно предположить рецепторный механизм рост-ускоряющего действия при сравнительно низких концентрациях. В порядке важной аналогии: влияние катехоламинов на прокариоты рассматриваются ныне в литературе с позиций quorum sensing-коммуникации [47, 48]. Предполагается, что дофамин, норадреналин (см. след. подраздел) и адреналин функционируют

как заместители аутоиндуктора AI-3 (бактериального сигнала) и, подобно ему, связываются рецепторными гистидинкиназами QseC и QseE у кишечной палочки.

1.5. Норадреналин. Норадреналин (рис. 1) отличается от дофамина лишь дополнительной гидроксильной группой в боковой углеродной цепи. Помимо животных (у которых он участвует в ответе на стресс), норадреналин обнаружен у многих видов растений, например, у крапивы, портулака и банана в листьях и плодах [34].

Норадреналин не обнаружен у микроводорослей *C. vulgaris* и *S. quadricauda* [38]. Однако добавленный норадреналин оказывает на обе микроводоросли влияние, аналогично таковому дофамина. Так, норадреналин в концентрации 1–10 мкМ вызывал ускорение роста *C. vulgaris* и некоторую стимуляцию накопления биомассы у *S. quadricauda* [38].

2. Нейротрансмиттеры и микроводоросли: экологические аспекты

Будучи фитопланктонными организмами, микроводоросли выступают как неотъемлемые компоненты разнообразных водных экосистем. Они производят около 50% атмосферного кислорода [49] и потребляют значительные количества парникового газа CO₂ в процессе фотосинтеза. Микроводоросли, включая цианобактерии, образуют важнейшую часть пищевой сети морских экосистем, обеспечивая энергией все трофические уровни над ними.

Как упоминалось выше, некоторые микроводоросли (например, *C. vulgaris* и *S. quadricauda*) не содержат определяемых с помощью ВЭЖХ количеств эндогенного серотонина, норадреналина и дофамина [38], но, тем не менее, реагируют на них. Стимулирующие рост микроводорослей нейрхимические вещества ацетилхолин, норадреналин, дофамин, серотонин и гистамин вырабатываются другими компонентами водных экосистем, в которых, как уже отмечено, микроводоросли являются частью фитопланктона. Дофамин, норадреналин и серотонин синтезируются представителями микробиоты (см. соответствующие обзорные публикации [40, 41]), и, следовательно, влияние этих соединений на микроводоросли может быть составной частью химического взаимодействия между микроводорослями и другими микроорганизмами. Темой будущих исследований является оценка концентраций нейромедиаторов в природных и искусственных водоемах. Понятно, что амплитуда и направление воздействия нейромедиаторов на водоросли (стимуляция или ингибирование) будут зависеть от диапазонов этих концентраций.

Дофамин вырабатывается животными, в частности, водными беспозвоночными. Например, дофамин в субмикромольных концентрациях был обнаружен с помощью ВЭЖХ в организме ра-

кообразного *Daphnia magna*, питающегося микроводорослями (наши неопубликованные данные). Таким образом, представляется возможным, что хищник вырабатывает вещество, стимулирующее рост микроводоросли как его добычи, что может иметь смысл с экологической точки зрения.

Серотонин и гистамин высвобождаются воспаленными или поврежденными тканями [1]. Следует ожидать, что травмированные водные животные выделяют нейротрансмиттеры в окружающую среду, влияя на рост водорослей в том же водоеме. Получается, что травмы, полученные водными животными, могут приводить к выделению веществ, воздействующих на рост водорослей, входящих в состав той же экосистемы.

Как уже упоминалось, дофамин образуется микроводорослями *Ulvaria obscura*, которые используют его для предотвращения поедания этих водорослей морскими ежами, брюхоногими, а также членистоногими [10]. Поэтому данная микроводоросль должна стимулировать рост микроводорослей при условии, что не превышен концентрационный порог, за которым прекращается стимулирующее рост действие дофамина (напомним, что в наших опытах дофамин стимулировал рост микроводорослей при концентрации не более 10 мкМ [38, 39]). Микроводоросль *U. obscura* образует густые «заросли», обуславливая «зеленые приливы»; при этом она выделяет дофамин в высоких концентрациях [31]. Соответственно, вокруг ее популяции должны формироваться две зоны с точки зрения роста микроводорослей: 1) «дальняя» зона, где концентрация дофамина разбавлена водой до низких (1–10 мкМ) значений и где должен наблюдаться ускоренный рост зеленых микроводорослей и 2) «ближняя», непосредственно окружающая «заросли» *Ulvaria*, зона, где стимуляции роста микроводорослей не будет.

Многие водные экосистемы функционируют с участием высших растений, которые как непосредственно входят в их состав (ряска, кувшинки и др.), так и обрастают берега, вступая в обмен химическими сигналами и регуляторами с водными организмами. Многие растения синтезируют нейромедиаторы и в то же время реагируют на них [3, 4, 44].

Показано, например, что нейротрансмиттеры содержатся в некоторых прибрежных растениях. В листьях растений, растущих по берегам прудов и озер парков городов южного Китая, таких как *Plumeria rubra*, *Syzygium jambos*, *Buxus megistophylla* и *Cinnamomum bodinieri*, обнаружены микромолярные количества серотонина и субмикромольные или микромолярные (у *C. bodinieri*) концентрации катехоламинов. 3-Метилтриптами́н, метаболит серотонина, также был обнаружен в листьях исследуемых растений, за исключением *B. megistophylla* [50]. Подобные растения могут выделять нейротрансмиттеры в водоемы — наряду с разнообразными

другими регуляторными веществами (например, фенольной природы), которые могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на рост и развитие микроводорослей в этих водоемах.

Живущие в водоемах рыбы (как и другие позвоночные) содержат нейротрансмиттеры в своих тканях [51]. Гистамин и другие нейротрансмиттеры организма рыб могут тем или иным путем оказываться непосредственно в воде (например, при ранении рыбы) и действовать на контактирующие с рыбами водоросли. Ткани организма пресноводной рыбы (толстолобик, карп, лещ) содержат порядка 28 мг гистамина на 1 кг биомассы, что соответствует примерно 20 мкмоль/кг [52]. С этой точки зрения примечательно, что гистамин (как уже указано в начале данной работы) стимулирует рост микроводорослей *C. vulgaris* [39] и *S. quadricauda* [38]. Разумеется, из организма рыбы (как и рассмотренных выше беспозвоночных) выделяется и много других органических соединений, а также соединения азота и фосфора. Последние также могут оказывать регуляторное влияние на микроводоросли. Так, выделяемая в среду дафниями мочевины индуцирует формирование компактных групп клеток (ценобиев) у *Scenedesmus subspicatum* [53].

3. Нейротрансмиттеры и микроводоросли: биотехнологические аспекты

Микроводоросли находят применение в современной биотехнологии, которую официально определяют как «любое технологическое применение биологических систем... или их препаратов» [54]. Биотехнологически полезные микроводоросли включают большое количество видов зеленых водорослей родов *Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, *Chlamydomonas*, *Botryococcus* и *Chlorococcum*, которые фактически используются или потенциально применимы в фармацевтических, диетических и косметических целях. Биотехнологии достаточно широко применяют также микроскопические красные водоросли (отдел Rhodophyta) – например, виды рода *Porphyridium*, а также представители родов *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia* (отдел Ochrophyta). Что касается цианобактерий, то они также используются как продуценты ценных соединений, включая косметические средства, пищевые добавки, фармацевтические препараты, биотопливо, биоудобрения, средства для очистки сточных вод и многое другое [55–59]. В биотехнологии широко применяются цианобактерии родов *Arthrospira* (ранее обозначавшиеся как *Spirulina*), *Nostoc*, *Anabaena* и *Aphanizomenon*.

Микроводоросли представляют особую ценность как источники веществ, способствующих укреплению здоровья человека, примером которых являются полиненасыщенные жирные кисло-

ты. Это омега-6-кислоты, такие как линолевая, γ-линоленовая и арахидоновая кислоты, а также омега-3-кислоты, включая эйкозапентаеновую и докозагексаеновую [57–59].

Практически важный вопрос заключается в том, как разработать экономичную и безопасную технологию крупномасштабного производства биомассы водорослей и содержащихся в ней ценных компонентов [58]. Один из подходов предполагает генную инженерию микроводорослей с введением в их геном генов, кодирующих ферменты биосинтеза биотехнологически важных продуктов [28, 60]. Многого можно добиться посредством увеличения продуктивности микроводорослей за счет подбора штаммов, оптимизации ростовых условий, усовершенствования биореакторов.

Нельзя не упомянуть также перспективы современной феномики, опирающейся на обширные базы данных по важным признакам (фенотипам) микроводорослей, для прицельного поиска оптимальных биотехнологических объектов [61], которые сочетают высокую скорость роста с высоким удельным выходом целевого продукта (например, полезного для здоровья человека антиоксиданта – астаксантина).

Все это не отменяет важность сравнительно экономичного подхода – добавления к культурам микроводорослей веществ, выступающих в невысоких концентрациях как стимуляторы их роста и/или производства целевых продуктов [28]. Представленные выше данные о стимуляции роста микроводорослей, вызываемой нейротрансмиттерами в низких (микромольных) концентрациях, могут быть использованы в биотехнологических целях. Потенциально можно разработать сравнительно недорогие методы, позволяющие биотехнологам значительно увеличить скорость роста некоторых промышленно полезных видов микроводорослей. Коммерческая конкурентоспособность такого пути максимизации накопления биомассы микроводорослей как продуцентов ценных соединений обусловлена сравнительно невысокой ценой нейромедиаторов, необходимых в низких концентрациях. Для создания концентрации ацетилхолина 0,1 мкМ, достаточной для стимуляции на 65–100% роста водорослей *Chlorella* и *Scenedesmus* ([29], неопубликованные данные авторов настоящего обзора) в биореакторе объемом 1 м³ требуется всего 18,2 мг хлорида ацетилхолина, при том что 5 г ацетилхолина хлорида стоят (компания Acros Organics, каталожный номер 159170050) 2660 руб. по состоянию на 7 ноября 2023 г., т.е. расход составляет всего 9,68 руб.

Изложенные факты представляют потенциальный интерес с точки зрения космонавтики, так как водоросли можно выращивать непосредственно на борту космического корабля, применяя солнечный свет как единственный доступный источник энер-

гии в космосе. Применение стимулирующих рост нейротрансмиттеров в космическом корабле позволило бы добиться увеличения выхода биомассы водорослей. Культивирование водорослей можно было бы дополнить выращиванием на борту корабля бактерий, продуцирующих нейротрансмиттеры. Эти бактерии — например, дофамин-продуцирующие штаммы *Escherichia coli* (обзорные монографии [40, 41]) — могут гетеротрофно расти на борту, способствуя рециклизации органических отходов.

Особый вопрос встает о пищевой безопасности нейротрансмиттеров и продуктов их метаболизма в культурах микроводорослей. Напомним, что, например, дофамин превращается в растительных клетках в дигидрофенилуксусную кислоту и далее гомованилиновую кислоту (рис. 3), а также другие небезопасные для человека продукты [3, 35]. По убеждению авторов, разработка безопасных протоколов очистки водорослевой биомассы для непосредственного пищевого применения и кормления дафний, в свою очередь служащих пищей для быстрорастущих рыб на борту космической станции или корабля, будет необходимым условием биотехнологического применения нейромедиаторов в космонавтике, возможно включая планируемые в КНР дальнейшие лунные миссии Чанъэ (Chang'e).

Потенциальную важность имеют данные о том, что нейротрансмиттеры — в частности, ацетилхолин — повышают содержание липидов в тестируемых видах водорослей, таких как *C. vulgaris*. Эти липиды и многие другие органические компоненты биомассы водорослей могут быть эффективно использованы в качестве экономичного и экологически чистого биотоплива. Отметим, что получение биотоплива на базе водорослей потенциально допускает разные сценарии: 1) поскольку липиды микроводорослей содержат триацилглицериды, замещение глицерина на метиловый или этиловый спирт в их молекулах позволяет получать биодизельное топливо; 2) возможны также различные методы конверсии биомассы (ферментация, пиролиз, биогазификация) в этанол, бутанол, ацетон, метан, водород и другие горючие продукты.

Двигатели космических кораблей могут работать на биотопливе, произведенном непосредственно на борту корабля с использованием зависящих от солнечного (или звездного) света микроводорослевых культур. Как уже указано, нейротрансмиттеры в количествах, достаточных для стимулирующего действия, могут быть получены с использованием нейротрансмиттер-продуцирующих бактериальных культур, поддерживаемых на космическом корабле в течение перелета и способных давать, например, сотни микромолей/л 2,3-дигидроксифенилаланина (ДОФА), предшественника дофамина (как пока-

зано в опытах с лактобациллами [62]). При этом микроводоросли обладают значительным потенциалом с точки зрения производства биодизельного топлива, поскольку содержание липидов в некоторых из них превышает их содержание в обычных масличных растениях [28].

Как уже отмечалось, нейротрансмиттеры способны не только стимулировать накопление биомассы микроводорослей; по крайней мере один из них — ацетилхолин — увеличивает процентное содержание ненасыщенных кислот у представителей рода *Chlorella* (особенно, α -линоленовой кислоты, содержание которой возрастает на 61,2% при добавлении ацетилхолина к *C. sorokiniana*) и *Scenedesmus* (неопубликованные данные авторов). Это в целом ведет к улучшению технических характеристик получаемого из биомассы микроводорослей биотоплива [28], хотя слишком высокое содержание полиненасыщенных кислот вызывает угрозу его неконтролируемого окисления.

Вопрос, который предстоит рассмотреть в будущих исследованиях, заключается в том, могут ли (и в каких концентрациях) нейротрансмиттеры увеличивать выработку длинноцепочечных углеводов (бионефти), которые продуцируются микроводорослями *Botryococcus*. На долю бионефти приходится до 75–80% их биомассы (по сухому веществу) [55, 58]. Она легко отделяется от биомассы центрифугированием и может быть использована в качестве компонента моторного топлива или сырья для химической промышленности.

4. Нейротрансмиттеры и микроводоросли: биомедицинские аспекты

Микроводоросли и их продукты обуславливают потенциальный интерес для исследования как источник новых фармакологически активных веществ, поскольку они представляют собой экологически чистую альтернативу химически синтезированным препаратам для лечения или профилактики различных заболеваний, включая диабет 1 и 2 типов, метаболический синдром и ожирение, воспалительные процессы, болезнь Альцгеймера, депрессию и другие психиатрические заболевания или расстройства, а также различные бактериальные, грибковые и вирусные инфекции. Полезное с медицинской точки зрения воздействие микроводорослей обусловлено наличием в их биомассе полисахаридов (особенно их сульфатированных производных), каротиноидов, фикобилипротеинов (в цианобактериях и красных водорослях), липидных компонентов (особенно полиненасыщенных жирных кислот), витаминов и большого количества других химических соединений [56–58].

4.1. Микроводоросли как источники пребиотиков. Нейрохимический аспект биомедицинской значимости видов микроводорослей связан с тем,

что углеводные компоненты и другие биологически активные вещества микроводорослей могут быть использованы в качестве *пребиотиков*, т.е. способствовать росту полезных симбиотических бактерий желудочно-кишечного тракта. Эти бактерии включают продуцентов нейротрансмиттеров или их предшественников [63–65]. Пример представляют различные виды бактерий (например, *E. coli*), которые способны производить в кишечнике человека ДОФА, ранее упомянутый предшественник дофамина и других катехоламинов. ДОФА проникает через барьер между кровотоком и мозгом (гематоэнцефалический барьер) и положительно влияет на мозг [1, 40, 41]. Приготовленные на базе микроводорослей короткие углеводные цепочки (олигосахариды) могут как пребиотики ускорять рост полезных бифидобактерий. Как уже отмечалось, некоторые бифидобактерии вырабатывают ценный нейротрансмиттер – γ-аминомасляную кислоту – в высоких концентрациях [66].

К сказанному следует добавить, что не только приготовленные из водорослевой биомассы пребиотики, но и сами клетки микроводорослей положительно влияют на полезные (пробиотические) бактериальные культуры, в том числе способные к синтезу нейротрансмиттеров. Примером таких потенциально полезных микроводорослевых культур является цианобактерия *Arthrospira platensis*, которая способствует росту полезных симбиотических бактерий в кишечнике, включая *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* и бифидобактерии. Данная цианобактерия подавляет избыточное развитие протеобактерий [67], в том числе потенциальных патогенов *Proteus vulgaris*, а также *Bacillus subtilis* и *B. pumilis* [56, 68, 69].

Возвращаясь к разделу 1 настоящей работы (о нейротрансмиттерах у микроводорослей), отметим важное направление будущих исследований, касающееся возможных терапевтических и профилактических применений микроводорослей, которые продуцируют нейротрансмиттеры. Нельзя ли, например, применить десмидиевую микроводоросль *Micrasterias denticulata* в качестве источника ацетилхолина? Подчеркнем, что этот нейромедиатор необходим для передачи импульсов через синапсы, например, между нервным окончанием и гладкомышечной клеткой кишечной стенки (и его дефицит может привести к нарушению нервной регуляции (дискинезии) кишечника).

4.2. Нейропротекторное действие микроводорослей, их экстрактов и основных компонентов. Речь идет о защите мозговых нервных клеток (нейронов) от повреждений при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона, деменцию, а также последствия церебральных инсультов и черепно-мозговых травм.

Нейропротекторные функции компонентов многих микроводорослей связаны с их антиоксидантным действием и способностью нейтрализовать активные формы кислорода и другие радикалы, подавлять воспалительные процессы (включая хроническое воспаление нервной системы, связанное с нейродегенеративными процессами), хелировать ионы железа, алюминия и других металлов, которые вызывают перекисное окисление липидов биомембран, в том числе и мозговых клеток. Поэтому компоненты микроводорослей препятствуют гибели нейронов, вызванной окислительным стрессом и воспалительным процессом, и тем самым предотвращают прогрессирование нейродегенеративных заболеваний [70, 71].

В частности, микроводоросли содержат полисахариды (фукоидан, ламинаран, каррагинан, агар, альгинат, протеогликан и др.), которые обладают высокой антиоксидантной активностью. Так, полисахариды *Isochrysis galbana*, *Pavlova viridis*, *Sarcinochrysis marina* эффективно перехватывают гидроксильные радикалы и ингибируют перекисное окисление липидов [70, 72].

У микроводорослей выявлено также более 600 различных каротиноидов, в том числе β-каротин, ликопин, лютеин, криптоксантин, астаксантин, кантаксантин. Например, нейропротекторное действие астаксантина связано с перехватом радикальных форм кислорода. Он также повышает уровень клеточного глутатиона, стимулирует активность супероксиддисмутазы (нейтрализующей супероксидные радикалы) и ингибирует образование опасного для клетки продукта перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот – малонового диальдегида. Астаксантин поэтому предотвращает повреждение и гибель нейронов [73].

Антиоксидантная активность микроводорослей также может быть связана с фенольными соединениями, такими как кумаровая, галловая и кофейная кислоты [74]. Они способствуют антиоксидантной активности у микроводорослей *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella* sp. и *Phaeodactylum* sp. Экстракт цианобактерии *Arthrospira maxima* содержит фенольные кислоты и проявляет антиоксидантную защиту в гомогенатах головного мозга крыс [75]. Экстракт *A. maxima* нейтрализует гидроксильные радикалы и ингибирует перекисное окисление липидов [76].

Некоторые микроводоросли способны ингибировать активность ферментов ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы, катализирующих деградацию ацетилхолина; поэтому применение их препаратов ведет к повышению действующих концентраций ацетилхолина в нервной системе [70].

Установлено, например, что гексановые и метанольные экстракты культур микроводорослей *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella minutissima*,

Tetraselmis chuii и *Rhodomonas salina* ингибируют активность ацетилхолинэстеразы *in vitro* [77]. Отметим в порядке сопоставления, что фенольные соединения (хлорогеновая и галловая кислота, кверцетин, рутин и кверцитрин), которые были идентифицированы у *Heinsia crinita* и *Clerodendrum volubile*, вносят вклад в антихолинэстеразную активность этих высших растений [78, 79].

Все большее внимание исследователей привлекает *депрессия*, психологическое расстройство, которое связано со снижением активности серотонин- и катехоламин-зависимых систем мозга [80]. Этанольный экстракт микроводоросли *Botryococcus terribilis* и выделенный из экстракта каротиноид облегчали депрессивное состояние у мышей в ходе теста, при котором их подвешивали за хвост. Экстракт *B. terribilis* повышал экспрессию генов, отвечающих за выделение нейротрансмиттеров, снижал экспрессию генов факторов нейровоспаления, увеличивал концентрации дофамина, норадреналина и серотонина в коре мозга и гипоталамусе мышей, а также повышал уровни мозгового фактора роста нейронов (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) [81].

4.3. Нейротоксическое действие микроводорослей и цианобактерий. Токсическое действие многих микроводорослей, включая цианобактерии, на клетки нервной системы во многом базируется на нейрохимических механизмах (типичным является влияние водорослевых токсинов на зависимые от нейротрансмиттера ацетилхолина синаптические контакты). Это токсическое действие вызывает экологическую угрозу, особенно в ходе вызываемых динофлагеллятами и другими микроводорослями «красных», «синих» или «зеленых» приливов.

В частности, динофлагелляты вырабатывают не менее 40 видов токсинов — циклических иминов, из которых наиболее многочисленную подгруппу представляют спиролиды. Циклические имины динофлагеллят накапливаются двусторчатыми моллюсками, и их употребление в пищу вызывает отравление. Действие иминов основано на связывании с никотиновыми рецепторами (nAChR) к ацетилхолину с блокированием ацетилхолин-зависимых (холинергических) процессов, например, передачи импульсов от нейронов к мышечным клеткам, что вызывает параличи [82].

Помимо циклических дииминов, динофлагелляты (*Alexandrium* sp., *Gymnodinium* sp., *Pyrodinium* sp.), а также некоторые цианобактерии выделяют пуриновый алкалоид сакситоксин [83]. Его механизм действия — блокада потенциал-зависимых натриевых каналов нервных волокон, что обуславливает параличи мышц, в частности дыхательной мускулатуры.

Золотистые микроводоросли *Prymnesium parvum* (представители Naptophyta) вырабатывают примнезины (поликетиды), оказывающие цито-

токсическое действие наподобие растительных сапонинов. Как и нейротоксины, примнезины воздействуют на ацетилхолин-зависимую передачу импульсов через нервно-мышечные синапсы [84].

Цианобактерии вырабатывают широкий спектр токсинов: циклические пептиды (в том числе микроцистины), алкалоиды, липопептиды, аминокислоты (не входящие в состав белков, например, β -N-метиламино-L-аланин), а также липопептиды [85]. Как цитотоксические вещества цианобактериальные агенты действуют на печень, кожу и другие мишени в организме, включая клетки нервной системы. Так, цианобактериальные алкалоиды, помимо упомянутого ранее сакситоксина, включают также связывающиеся с nAChR-рецепторами и блокирующие холинергические нейроны анатоксины — в частности, анатоксин *a* и его гомолог гомоанатоксин *a* (где ацетильная группа заменена на пропионильную) [85, 86].

Вырабатываемые цианобактериями *Anabaena flos-aquae* нейротоксины парализуют движение зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и стимулируют осаждение ее клеток, как показано в лабораторных условиях [87]. Можно предположить, что и в водоемах цианобактерии создают таким путем свободные от конкурентов зоны. Это способствует их размножению и экологически опасному цианобактериальному «цветению водоема», особенно если в нем присутствуют антропогенные источники азота и фосфора.

Важно отметить, что в списке производящих токсины цианобактерий есть и представители родов, которые используются в пищевой промышленности и в косметике (например, род *Aphanizomenon*), имея международный статус Generally Regarded as Safe (GRAS). Необходимо поэтому тщательное тестирование этих цианобактерий в плане их потенциальной токсичности.

Заключение

Итак, представители микроводорослей вырабатывают нейромедиаторы и/или реагируют на их добавление в среду. В перспективе стимулирующее рост влияние ряда нейротрансмиттеров — например, серотонина, дофамина, норадреналина, гистамина [38, 39], ацетилхолина и таурина [5, 28, 29] — на микроводоросли может лечь в основу новых методов увеличения выхода биомассы водорослей и производства полиненасыщенных жирных кислот, хлорофиллов, углеводов, белков и других биотехнологически ценных соединений.

Особый консорциум, обитающий в нашем желудочно-кишечном тракте и включающий множество полезных видов микроорганизмов, потенциально может быть объектом воздействия препаратов микроводорослей, способных синтезировать нейромедиаторы или стимулировать их продукцию микробиотой организма человека.

Микроводоросли способны к нейропротекторному действию в силу своей антиоксидантной активности, а также способности хелировать металлы и подавлять воспалительные процессы.

Настоящий обзор посвящен подгруппе нейротрансмиттеров, называемых биогенными аминами (серотонин, дофамин, гистамин и т.д.). Существуют и другие важные подгруппы нейротрансмиттеров, такие как аминокислоты, пептиды, пурины и даже газообразные вещества, примером которых являются NO, CO и H₂S [88]. Эти подгруппы нейротрансмиттеров еще предстоит

исследовать в отношении их роли у микроводорослей.

Исследование проведено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды». Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубынин В.А., Каменский А.А., Сапин М.Р., Сивоглазов В.Н. *Регуляторные системы организма человека*. М.: Дрофа; 2010. 368 с.
2. Buznikov G.A. Preneural transmitters as regulators of embryogenesis. Current state of problem. *Russ. J. Dev. Biol.* 2007;38(4):213–220.
3. Roshchina V.V. Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health*. Eds. M. Lyte and P.P.E. Freestone. N.Y.: Springer; 2010:17–52.
4. Roshchina V.V. New trends in perspectives in the evolution of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health Advances in Experimental Biology and Medicine*. Ed. M. Lyte. N.Y.: Springer; 2016:25–72.
5. Oleskin A.V., Postnov A.L. Neurotransmitters as communicative agents in aquatic ecosystems. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(1):6–12.
6. Pasteels J.M. Ecomones: messages chimiques des écosystèmes. *Ann. Soc. R. Zool. Belg.* 1972:103–117.
7. Pasteels J.M. Is kairomone a valid and useful term? *J. Chem. Ecol.* 1982;8(7):1079–1081.
8. Ronga D., Biazzi E., Parati K., Carminati D., Carminati E., Tava A. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy*. 2019;9(4):192.
9. Oleskin A.V., Boyang C. Microalgae in terms of biomedical technology: probiotics, prebiotics, and metabiotics. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022;58(6):635–648.
10. Van Alstyne K.L., Ridgway R.L., Nelson A. Neurotransmitters in marine and freshwater algae. *Neurotransmitters in Plants: Perspectives and Applications*. Eds. A. Ramakrishna and V.V. Roshchina. Boca Raton: CRC Press; 2018:27–36.
11. Thurman H.V. *Introductory oceanography*. New Jersey: Prentice Hall College; 1997. 544 pp.
12. Rolle I., Hobucher H.E., Kneifel H., Pascold B., Piepe W., Soeder C.J. Amines in unicellular green algae: 2. Amines in *Scenedesmus acutus*. *Anal. Biochem.* 1977;77(1):103–109.
13. Dale H.H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1914;6 (2):147–190.
14. Loewi O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflug Arch. Ges. Phys.* 1922;193(1):201–213.
15. Loewi O., Navratil E. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflug Arch. Ges. Phys.* 1926;214(1):678–688.
16. Zeisel S.H. A brief history of choline. *Ann. Nutr. Metab.* 2012;61(3):254–258.
17. Wall R., Cryan J.F., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Dinan T.G., Stanton C. Bacterial neuroactive compounds produced by probiotics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014;817:221–239.
18. Johnson K.V.A., Foster K.R. Why does the microbiome affect behavior? *Nat. Rev. Microbiol.* 2018;16(10):647–655.
19. Baig A. M., Rana Z., Tariq S., Lalani S., Ahmad H.R. Traced on the timeline: discovery of acetylcholine and the components of the human cholinergic system in a primitive unicellular eukaryote *Acanthamoeba* spp. *ACS Chem. Neurosci.* 2018;9(3):494–504.
20. Parker M.S., Mock T., Armbrust E.V. Genomic insights into marine microalgae. *Annu. Rev. Genet.* 2008;42:619–645.
21. Gupta V., Thakur R.S., Reddy C.R.K., Jha B. Central metabolic processes of marine macrophytic algae revealed from NMR-based metabolome analysis. *RSC Adv.* 2013;3(19):7037–7047.
22. Barwell C.J. Acetylcholine in the red alga *Laurencia obtusa* (Huds.). *Lamour. Bot. Mar.* 1980;23:63–64.
23. Dean B. Evolution of the human CNS cholinergic system: has this resulted in the emergence of psychiatric disease? *Aust. N. Z. J. Psychiatry.* 2009;43(11):1016–1028.
24. Smallman B.N., Maneckjee A. The synthesis of acetylcholine by plants. *Biochem. J.* 1981;194(1):361–364.
25. Юрин В.М. *Биомедиаторы в растениях: курс лекций*. Мн.: БГУ; 2004. 128 с.
26. Schiechl G., Himmelsbach M., Buchberger W., Kerschbaum H. H., Lütz-Meindl U. Identification of acetylcholine and impact of cholinomimetic drugs on cell differentiation and growth in the unicellular green alga *Micrasterias denticulate*. *Plant Sci.* 2008;175(3):262–266.
27. Lütz-Meindl U. Micrasterias as a model system in plant cell biology. *Front. Plant Sci.* 2016;7(82):999.

28. Parsaiemehr A., Sun Z., Dou X., Chen Y.F. Simultaneous improvement in production of microalgal biodiesel and high-value alpha-linolenic acid by a single regulator acetylcholine. *Biotechnol. Biofuels*. 2015;8(1):11.
29. Czerpak R., Bajguz A., Jewiec P., Muszynska-Garstka M. The influence of acetylcholine and taurine on the content of some metabolites in the alga *Chlorella vulgaris*. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 2003;3(2):223–229.
30. Sobotka T.J. *Studies on acetylcholine levels in mouse brain*. Ph. D. Dissertation. Chicago: Loyola University; 1969. 247 pp.
31. Van Alstyne K.L., Harvey E.L., Cataldo M. Effects of dopamine, a compound released by the greentide macroalga *Ulvaria obscura* (Chlorophyta), on marine algae and invertebrate larvae and juveniles. *Phycologia*. 2014;53(2):195–202.
32. Fillafer C., Schneider M.F. On the excitation of action potentials by protons and its potential implications for cholinergic transmission. *Protoplasma*. 2016;253(2):357–365.
33. Skulachev V.P. *Membrane bioenergetics*. Berlin, N.Y.: Springer-Verlag; 1988. 442 pp.
34. Roshchina V.V. *Biomediators in plants. Acetylcholine and biogenic amines*. Pushchino: Biology Center, USSR Academy of Sciences; 1991. 193 pp.
35. Рощина В.В. *Нейротрансмиттеры – биомедиаторы и регуляторы растений*. М.: Информика; 2010. 120 с.
36. Roshchina V.V., Yashin V.A., Podunai Y.A. Fluorescence in the study of diatom *Ulnaria ulna* cells. *Austin Environ. Sci.* 2022;7(3):1077.
37. Beilby M.J., Turi C.E., Baker T.C., Tym F.J., Murch S.J. Circadian changes in endogenous concentrations of indole-3-acetic acid, melatonin, serotonin, abscisic acid and jasmonic acid in Characeae (*Chara australis* Brown). *Plant Signal. Behav.* 2015;10:1082697.
38. Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang C. Impact of biogenic amines on the growth of green microalgae. *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2021;11:144–150.
39. Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang C. Impact of biogenic amines on the growth of a *Chlorella vulgaris* culture. *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2021;11:P.49–53.
40. Oleskin A.V., Shenderov B.A. *Microbial communication and microbiota-host interactions: biomedical, biotechnological, and biopolitical implications*. Hauppauge (N.Y.): Nova Science Publishers; 2020. 371 pp.
41. Олескин А.В., Шендеров Б.А., Роговский В.С. Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота-хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Изд-во МГУ; 2020. 286 с.
42. Knecht L.D., O'Connor G.O., Mittal R., Liu X.Z., Daftarian P., Deo S.K., Daunert S. Serotonin activates bacterial quorum sensing and enhances the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the host. *EBioMedicine*. 2016;9:161–169.
43. Oleskin A.V., Kirovskaya T.A., Botvinko I.V., Lysak L.V. Effect of serotonin (5-hydroxytryptamine) on microbial growth and differentiation. *Microbiology (Mosc.)*. 1998;67(3):306–311.
44. Ramakrishna A., Mukherjee S. New insights on neurotransmitter signaling mechanisms in plants. *Plant Signal. Behav.* 2020;15(6):1737450.
45. Medina V.A., Rivera E.S. Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 2010;161(4):755–767.
46. Kulma A., Szopa J. Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Science*. 2007;172(3):433–440.
47. Clarke M.B., Hughes D.T., Zhu C., Boedeker E.C., Sperandio V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(27):10420–10425.
48. Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T.K., Jayaraman A. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect. Immun.* 2007;75(9):4597–4607.
49. Chapman R.L. Algae: the world's most important "plants"—an introduction. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change*. 2013;15(6):5–12.
50. Boyang C., Oleskin A.V., Vlasova T. Detecting biogenic amines in food and drug plants with HPLC: medical and nutritional implications. *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2020;10(3):88–91.
51. Fontaine R., Affaticati R., Yamamoto K., Jolly C., Bureau C., Baloch S., Gounet F., Vermir P., Dufour S., Pasqualini C. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D2 receptor subtypes. *Neuroendocrinology*. 2013;154(2):807–818.
52. Иванова Е.Е., Луканова Н.Н. Содержание гистамина в рыбе и рыбных продуктах. *Изв. вузов. Пищ. технол.* 1998;5–6:18–19.
53. Wiltshire K.H., Lampert W. Urea excretion by *Daphnia*: A colony-inducing factor in *Scenedesmus*? *Limnol. Oceanol.* 1999;44(8):1894–1903.
54. Convention on Biological Diversity. Article 19 [Электронный ресурс]. 2011. URL: <https://www.cbd.int/convention/text> (дата обращения: 29.11.2022).
55. Chye J.T.T., Jub L.Y., Yon L.S., Pan S., Danquah M.K. Biofuel production from algal biomass. *Bioenergy and Biofuels*. Ed. O. Konur. Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis Group; 2018:87–117.
56. Camacho F., Macedo A., Malcata F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: a short review. *Mar. Drugs*. 2019;17(6):312.
57. Khavari F., Saidijam M., Taheri M., Nouri F. Microalgae: therapeutic potentials and applications. *Mol. Biol. Rep.* 2021;48(5): 4757–4765.
58. Balasubramaniam V., Gunasegavan R.D., Mustar S., Lee J.C., Mohd Noh M.F. Isolation of industrial important bioactive compounds from microalgae. *Molecules*. 2021;26(4):943.
59. Bello A.S., Saadoui I., Ben-Hamadou R. "Beyond the source of bioenergy:" microalgae in modern agriculture as a biostimulant, biofertilizer, and anti-abiotic stress. *Agronomy*. 2021;11(8):1610.
60. Roessler P.G., Bleibaum J.L., Thompson G.A., Ohlroge J.B. Characteristics of the gene that encodes acetyl-CoA carboxylase in the diatom *Cyclotella cryptica*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994;721:250–256.
61. Fabris M., Abbriano R.M., Pernice M., Sutherland D.L., Commault A.S., Hall C.C., Labeeuw L., McCauley J.I., Kuzhiuparambil U., Ray P., Kahlke T., Ralph P.J. Emerging technologies in algal biotechnology:

toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. *Front. Plant Sci.* 2020;11:279.

62. Oleskin A.V., Zhilenkova O.G., Shenderov B.A., Amerhanova A.M., Kudrin V.S., Klodt P.M. Lactic-acid bacteria supplement fermented dairy products with human behavior-modifying neuroactive compounds. *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2014;4(3):199–206.

63. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 2018;1693(Part B):128–133.

64. Lyte M. Microbial endocrinology: an ongoing personal journey. *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health*. Ed. M. Lyte. N.Y.: Springer; 2016:1–24.

65. Tsavkelova E.A., Botvinko I.V., Kudrin V.S., Oleskin A.V. Detecting neuromediator amines in microorganisms with high performance liquid chromatography. *Dokl. Biochem.* 2000;372(1–6):840–842.

66. Pokusaeva K., Johnson C., Luk B., Uribe G., Fu Y., Oezguen N., Matsunami R.K., Lugo M., Major A., Mori-Akiyama Y., Hollister E.B., Dann S.M., Shi X.Z., Engler D.A., Savidge T., Versalovic J. GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 2017;29(1):12904.

67. Sorrenti V., Castagna D.A., Fortinguer S., Burini A., Scapagnini G., Willcox D.C. *Spirulina* microalgae and brain health: a scoping review of experimental and clinical evidence. *Mar. Drugs.* 2021;19(6):293.

68. Hamed I., Özogul F., Özogul Y., Regenstein J.M. Marine bioactive compounds and their health benefits: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2015;14(4):446–465.

69. Beheshtipour H., Mortazavian A.M., Haratian P., Khosravi-Darani K. Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *Eur. Food Res. Technol.* 2012;235:719–728.

70. Olasehinde T.A., Olaniran A.O., Okoh A.I. Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules.* 2017;22(3):480.

71. Olasehinde O.A., Odjadjare E.C., Mabinya L.V., Olaniran A.O., Okoh A.I. *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella minutissima* exhibit antioxidant potentials, inhibit cholinesterases and modulate disaggregation of β -amyloid fibrils. *Electron. J. Biotechnol.* 2019;40(16):1–9.

72. Sun Y., Wang H., Guo G., Pu Y., Yan B. The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Carbohydr. Polym.* 2014;113(4):22–31.

73. Wu Q., Zhang X.S., Wang H.D., Zhang X., Yu Q., Li W., Zhou M.L., Wang X.L. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury. *Mar. Drugs.* 2014;12(12):6125–6141.

74. Safafar H., Wagenen J., Möller P., Jacobsen C. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Mar. Drugs.* 2015;13(12):7339–7356.

75. Miranda M.S., Cintra R.G., Barros S.B., Mancini F.J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998;31(8):1075–1079.

76. El-Baky H.H.A., El Baz F.K., El-Baroty G.S. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *Afr. J. Biotechnol.* 2009;8(24):7059–7067.

77. Custódio L., Justo T., Silvestre L., Barradas A., Duarte C.C., Pereira H., Barreira L., Rauter A.P., Alberício F., Varela J. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chem.* 2012;131(1):134–140.

78. Oboh G., Nwanna E.E., Oyeleye S.I., Olasehinde T.A., Ogunsuyi O.B., Boligon A.A. In vitro neuroprotective potentials of aqueous and methanol extracts from *Heinsia crinita* leaves. *Food Sci. Hum. Wellness.* 2016;5(2):95–102.

79. Oboh G., Ogunruku O.O., Oyeleye S.I., Olasehinde T.A., Ademoseun A.O., Boligon A.A. Phenolic extracts from *Clerodendrum volubile* leaves inhibit cholinergic and monoaminergic enzymes relevant to the management of some neurodegenerative diseases. *J. Dietary Suppl.* 2016;14(3):358–371.

80. Masters R.D. Why study serotonin, social behavior and the law? *The Neurotransmitter Revolution. Serotonin, Social Behavior and the Law*. Eds. R.D. Masters and M.T. McGuire. Carbondale, Edwardsville: Southern Illinois University Press; 1994:3–16.

81. Sasaki K., Linh T.N., Hirano A., Tominaga K., Nakaga S., Nozaki H., Arimura T., Isoda H. Microalgae extract induces antidepressant-like activity via neuroinflammation regulation and enhances the neurotransmitter system. *Food Chem. Toxicol.* 2022;170(3):113508.

82. Molgó J., Marchot P., Aráoz R., Benoit E., Iorga B.I., Zakarian A., Taylor P., Bourne Y., Servent D. Cyclic imine toxins from dinoflagellates: a growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 2017;142(Suppl. 2):41–51.

83. Landsberg J.H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.* 2002;10(2):113–390.

84. Manning S.R., La Claire J.W. II. Prymnesins: toxic metabolites of the golden alga, *Prymnesium parvum* Carter (Haptophyta). *Mar. Drugs.* 2010;8(3):678–704.

85. Du X., Liu H., Yuan L., Wang Y., Ma Y., Wang R., Chen X., Losiewicz M.D., Guo H., Zhang H. The diversity of cyanobacterial toxins on structural characterization, distribution and identification: a systematic review. *Toxins.* 2019;11(9):530.

86. Aas P., Eriksen S., Kolderup J., Lundy P., Haugen J.E., Skulberg O.M., Fonnum F. Enhancement of acetylcholine release by homoanatoxin-a from *Oscillatoria Formosa*. *ETAP.* 1996;2(2–3):223–232.

87. Kearns K.D., Hunter M.D. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microb. Ecol.* 2001;42(1):80–86.

88. Oleskin A.V., Shenderov B.A. Neuromodulatory effects and targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2016;27(1):30971–30982.

Поступила в редакцию 07.03.2023

После доработки 08.09.2023

Принята в печать 10.11.2023

REVIEW

Impact of neurotransmitters on microalgae: conceptual and practical implications

A.V. Oleskin¹, * , Cao Boyang²

¹*General Ecology and Hydrobiology Department, Biology Faculty, Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;*

²*Shenzhen MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Dayun New Town,
Longgang District, Shenzhen, 518172, Guangdong Province, China*

*e-mail oleskiny@yandex.ru

Apart from their functions in the nervous system of animals, neurotransmitters operate as regulatory agents and signals in diverse kingdoms of life. Many neurotransmitters at low concentrations exert specific effects on microalgae, predominantly functioning as algal growth stimulators. Neurotransmitters that promote microalgal biomass accumulation and enhance the synthesis of lipids, polysaccharides, and other valuable products are of much potential biotechnological interest in terms of projects aimed at producing “algal” drugs and food additives, as well as biodiesel and other kinds of biofuel. Some microalgal species synthesize their own neurotransmitters and/or facilitate their synthesis by the symbiotic microbiota in the gastro-intestinal tract and, therefore, are expected to promote human physical and mental health. Microalgae can exert neuroprotective effects; nevertheless, many microalgae produce toxins affecting the functioning of the nervous system.

Keywords: *microalgae, biotechnology, neurotransmitters, biogenic amines, serotonin, histamine, dopamine, norepinephrine, the microbiota-gut-brain axis*

Funding: This research was supported by the Development Program of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Lomonosov Moscow State University titled “The Future of the Planet and Global Environmental Change.”

Сведения об авторах

Олескин Александр Владимирович — докт. биол. наук, проф. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-903-507-22-58; e-mail: oleskiny@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6816-1615>

Боян Цао — аспирант кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-363-30-05; e-mail: caoby@smbu.edu.cn

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.084.1+616.995.121

Исследование противовоспалительных свойств секреторно-эксcretорных продуктов плероцеркоидов лентеца чаечного *Dibothriocephalus dendriticus* и лигулы *Ligula interrupta*

А.Н. Павлюченкова^{1, 2} , И.А. Кутырев^{1, *} , А.В. Федоров³ ,
М.А. Челомбитко² , О.Е. Мазур¹ , Ж.Н. Дугаров¹

¹Институт общей и экспериментальной биологии, Сибирское отделение Российской академии наук, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6;

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;

³Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: ikutyrev@yandex.ru

В данной работе впервые был исследован противовоспалительный потенциал секреторно-эксcretорных продуктов (СЭП) плероцеркоидов лентеца чаечного *Dibothriocephalus dendriticus* и лигулы *Ligula interrupta* в модели индуцированной липополисахаридом активации макрофагов *in vitro*. В качестве модели макрофагов была использована клеточная линия моноцитов, полученная от пациента с острым моноцитарным лейкозом, ТНР-1. Противовоспалительные свойства СЭП определяли по содержанию в инкубационной среде цитокинов — фактора некроза опухоли и интерлейкина-6 — с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа. Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* обладают выраженным противовоспалительным эффектом, в то время как СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* таким эффектом не обладают. Далее мы исследовали противовоспалительные свойства СЭП *L. interrupta* в модели каррагинан-индуцированного воспаления в «воздушном мешке» у мышей. Было обнаружено значимое уменьшение объема воспалительного экссудата под действием СЭП *L. interrupta*, а также увеличение уровня цитокина интерлейкина-6. В то же время СЭП *L. interrupta* не оказывали влияния на число клеток в 1 мл экссудата, а также на уровень провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли. Низкомолекулярная фракция СЭП *L. interrupta* также увеличивала уровень противовоспалительного цитокина интерлейкина-10, что свидетельствует о более выраженном противовоспалительном эффекте по сравнению с высокомолекулярной фракцией. Полученные результаты, в целом, свидетельствуют о противовоспалительных свойствах СЭП плероцеркоидов *L. interrupta*. Однако механизм противовоспалительного действия не выяснен и требует дальнейшего исследования.

Ключевые слова: лентец чаечный, *D. dendriticus*, лигула, *L. interrupta*, макрофаги, воспаление, гельминты

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-1

Введение

Среди множества ключевых направлений биотехнологических и биомедицинских исследований одними из наиболее актуальных являются поиск и выделение новых природных соединений с биотехнологической и биофармацевтической активностью. В последние два десятилетия усилился интерес к использованию иммунорегуляторных свойств секреторно-эксcretорных продуктов (СЭП) гельминтов для терапии воспалительных и аллергиче-

ских заболеваний, включая астму, болезнь Крона, сахарный диабет (включая диабетические язвы) и др., при которых гормональная терапия приводит к тяжелым побочным эффектам [1–3]. На современном этапе развития молекулярной паразитологии биофармацевтический потенциал был исследован, главным образом, у трематод и нематод, вызывающих гельминтозы человека и представляющих большую практическую значимость в медицине [4–6]. Информации о таких исследованиях

в классе Cestoda крайне мало, до начала наших исследований было изучено всего три вида цестод: *Taenia crassiceps*, *Hymenolepis diminuta* и *Echinococcus granulosus* [7–11]. Согласно базам данных известных нуклеотидных и белковых последовательностей, две трети белков цестод по строению значительно отличаются от белков других изученных живых организмов и, соответственно, обладают неизвестными функциями. Поэтому, учитывая то, что цестоды миллионы лет специализируются на жизни внутри живых организмов и взаимодействии с ними, геном цестод можно рассматривать как библиотеку различных неизвестных биологически активных соединений [12]. Участниками нашего коллектива впервые начато систематическое исследование микроанатомических особенностей распределения иммуномодуляторов в организме цестод. Получены первые данные по распределению простагландина E₂, серотонина, гамма-аминомасляной кислоты, пептида Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ в организме *Dibothriocephalus dendriticus* (Nitzsch, 1824) [13–16]. Изучены ультраструктурные механизмы и кинетика вывода секрета на поверхность тегумента цестод *D. dendriticus* и *Ligula interrupta* (Rudolphi, 1810) в ответ на стимуляцию сывороткой крови хозяев – рыб [17].

Имеются сведения о том, что паразиты и их СЭП могут оказывать противовоспалительное действие, в частности, за счет влияния на клетки врожденного иммунитета. Так, было показано, что СЭП *Trichinella spiralis* снижают уровень индуцированной липополисахаридом (ЛПС) воспалительной активации макрофагов, а также стимулирует их поляризацию по M2-противовоспалительному фенотипу [18, 19]. За этот эффект может быть, в частности, ответственен цистатин [20]. Похожий эффект был продемонстрирован для соединений гельминтов, содержащих фосфорилхолин. В частности, конъюгат фосфорилхолина с тетрапептидом тафтсином стимулирует дифференцировку M2-макрофагов и продукцию противовоспалительного цитокина интерлейкина (ИЛ) 10 в ряде моделей воспалительных и аутоиммунных заболеваний [21, 22].

В связи с этим в настоящей работе мы исследовали противовоспалительный потенциал СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* в модели ЛПС-индуцированной активации макрофагов *in vitro*. Кроме того, мы изучили противовоспалительные свойства СЭП *L. interrupta* в модели каррагинан-индуцированного воспаления в «воздушном мешке» у самцов мышей линии C57Bl/6.

Материалы и методы

Получение СЭП. Извлеченных из полости тела хозяев плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* очищали от антигенов хозяина путем промывки в 0,65%-ном физрастворе для холоднокровных животных, после чего инкубировали в буфере Хэнкса с добавлением 10⁵ МЕ/л пенициллина и 100 мг/л

линкомицина в течение 6 ч при 4°C. Для выделения белковых фракций СЭП паразитов инкубационную среду центрифугировали в концентрирующих колонках, пропускающих молекулы с молекулярной массой не более 3 кДа (Merck Millipore, Ирландия). Высокомолекулярные (содержащие молекулы массой более 3 кДа) и низкомолекулярные фракции (содержащие молекулы массой менее 3 кДа) СЭП были использованы в дальнейших экспериментах. После количественного измерения белка в полученных фракциях с использованием метода Брэдфорда образцы пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Minisart Sartorius, Германия). Длительное хранение образцов осуществляли при -80°C.

Культивирование клеток и схема их обработки. Исследования проводили на клетках линии острого моноцитарного лейкоза ТНР-1. Для культивирования клеток использовали среду RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 0,3 г/л L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 10%-ным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Эксперименты проводили при 37°C и 5% CO₂ на 96- и 12-луночных планшетах для адгезионных культур (Corning, США), клетки в концентрации 500 тыс. клеток/мл для дифференцировки в макрофаги инкубировали 48 ч с добавлением 100 нМ форболового эфира (Sigma, США). Дифференцированные клетки инкубировали на протяжении ночи с СЭП плероцеркоидов в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл, после чего стимулировали ЛПС (*E. coli* 0127:B8, Sigma, США) в концентрации 100 нг/мл в течение 3 ч для исследования противовоспалительных свойств СЭП паразитов. Для длительного хранения и последующего измерения уровня цитокинов полученный после центрифугирования инкубационной среды супернатант помещали в кельвина-тор при -80°C.

Анализ цитотоксичности. Оценку цитотоксической активности СЭП паразитов проводили с использованием резазуринового теста. Клетки линии ТНР-1 высевали в 96-луночный планшет из расчета 10 тыс. клеток на лунку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ на протяжении ночи с СЭП плероцеркоидов в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл. Жизнеспособность клеток определяли через 24 ч после отмывки в среде для культивирования путем инкубации с 1,25 мМ раствором резазурина (Sigma-Aldrich, США) в течение 3 ч при 37°C и 5% CO₂. Флуоресценцию образцов регистрировали с использованием планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, США) при длинах волн поглощения и эмиссии 560 нм и 590 нм соответственно.

Определение концентрации цитокинов в среде культивирования. Концентрации провоспалительных Th-1-цитокинов – фактора некроза опухоли (ФНО) и ИЛ-6, а также противовоспалительных

Th2-цитокинов — ИЛ-4 и ИЛ-10 — определяли с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя.

Модель каррагинан-индуцированного воспаления в «воздушном мешке». Работу проводили на самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 12–15 нед., полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая». Животных содержали в виварии Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук. Протокол исследования на мышах был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 1 от 31.10.2022 г.). Мыши были разделены на четыре группы:

1) Контрольная группа мышей ($n = 5$) без воспаления в «воздушном мешке».

2) Контрольная группа мышей ($n = 5$) с каррагинан-индуцированным воспалением в «воздушном мешке».

3) Опытная группа мышей ($n = 5$) с предварительным введением высокомолекулярной фракции (с массой молекул более 3 кДа) СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* и каррагинан-индуцированным воспалением в «воздушном мешке».

4) Опытная группа мышей ($n = 5$) с предварительным введением низкомолекулярной фракции (с массой молекул менее 3 кДа) СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* и каррагинан-индуцированным воспалением в «воздушном мешке».

Все травматичные для животных манипуляции проводили под наркозом — золетил (Virbac, Франция), 40 мг/кг массы тела. В 1-е сут эксперимента в межлопаточной области мышей формировали подкожные мешки путем инъекции 4 мл стерильного воздуха; на 4-е сут повторно вводили 2 мл воздуха. На 6-е сут в подкожный мешок опытных мышей вводили 500 мкл СЭП плероцеркоидов *L. interrupta*, животным контрольных групп — аналогичный объем физраствора. На 7-е сут внутри мешка индуцировали острое воспаление инъекцией 1 мл 1%-ного раствора каррагинана (Sigma, США) в 0,9%-ном NaCl. Контрольным животным без воспаления вместо каррагинана вводили аналогичный объем физраствора. Через 4 ч после этого мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Из подкожного мешка забирали воспалительный экссудат, определяли его объем и содержание клеток в нем. После центрифугирования (15 мин при 1500g и 4°C) супернатант использовали для выявления ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-10 с помощью готовых наборов для иммуноферментного анализа (eBioscience, США).

Анализ и представление данных. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую обработку результатов

осуществляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 путем сравнения групп с помощью двухстороннего дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественных сравнений Даннета. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Гельминты являются мощными иммунорегуляторами, что представляет основу их длительного существования в организме хозяина. Регуляция иммунитета осуществляется путем секреции в организм хозяина иммунорегуляторных веществ белковой и небелковой природы. Паразиты обычно переключают иммунный ответ хозяина с Th1- на Th2-тип, что приводит к подавлению воспалительных процессов [23–25]. В последние годы идет активная разработка средств лечения аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний, основанных на использовании гельминтов, их компонентов и СЭП или отдельных рекомбинантных белков. Была показана эффективность таких средств при лечении воспалительных заболеваний кишечника, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки, диабета 1-го типа, аутоиммунного энцефаломиелита, сепсиса, аллергического ринита [21, 22, 26–31].

В настоящем исследовании мы оценили противовоспалительный эффект СЭП двух видов цестод, *D. dendriticus* и *L. interrupta*, *in vitro* и *in vivo*. В своей работе в качестве модели макрофагов мы использовали моноциты линии ТНР-1, дифференцированные в макрофагоподобные клетки с помощью форболового эфира. Данная клеточная линия получена от пациента с острым моноцитарным лейкозом и широко применяется в исследованиях дифференцировки макрофагов [32]. Кроме того, данная клеточная линия уже использовалась для оценки противовоспалительного эффекта СЭП паразитов [33]. В связи с этим выбор данной клеточной линии для исследования противовоспалительных свойств белковых фракций СЭП цестод в модели воспалительной активации макрофагов ТНР-1, индуцированной ЛПС, представляется целесообразным.

Для того чтобы оценить цитотоксическое действие СЭП плероцеркоидов на дифференцированные клетки ТНР-1, мы провели резазуриновый тест. Результаты этого анализа показали, что инкубация клеток в течение 24 ч с СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* с содержанием белка в диапазоне от 1 до 100 мкг/мл не приводит к снижению жизнеспособности клеток (рис. 1А).

На следующем этапе мы исследовали противовоспалительное действие СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* на ЛПС-индуцированную активацию дифференцированных клеток ТНР-1. ЛПС вызывает поляризацию макрофагов в М1-тип, характеризующийся провоспалительным

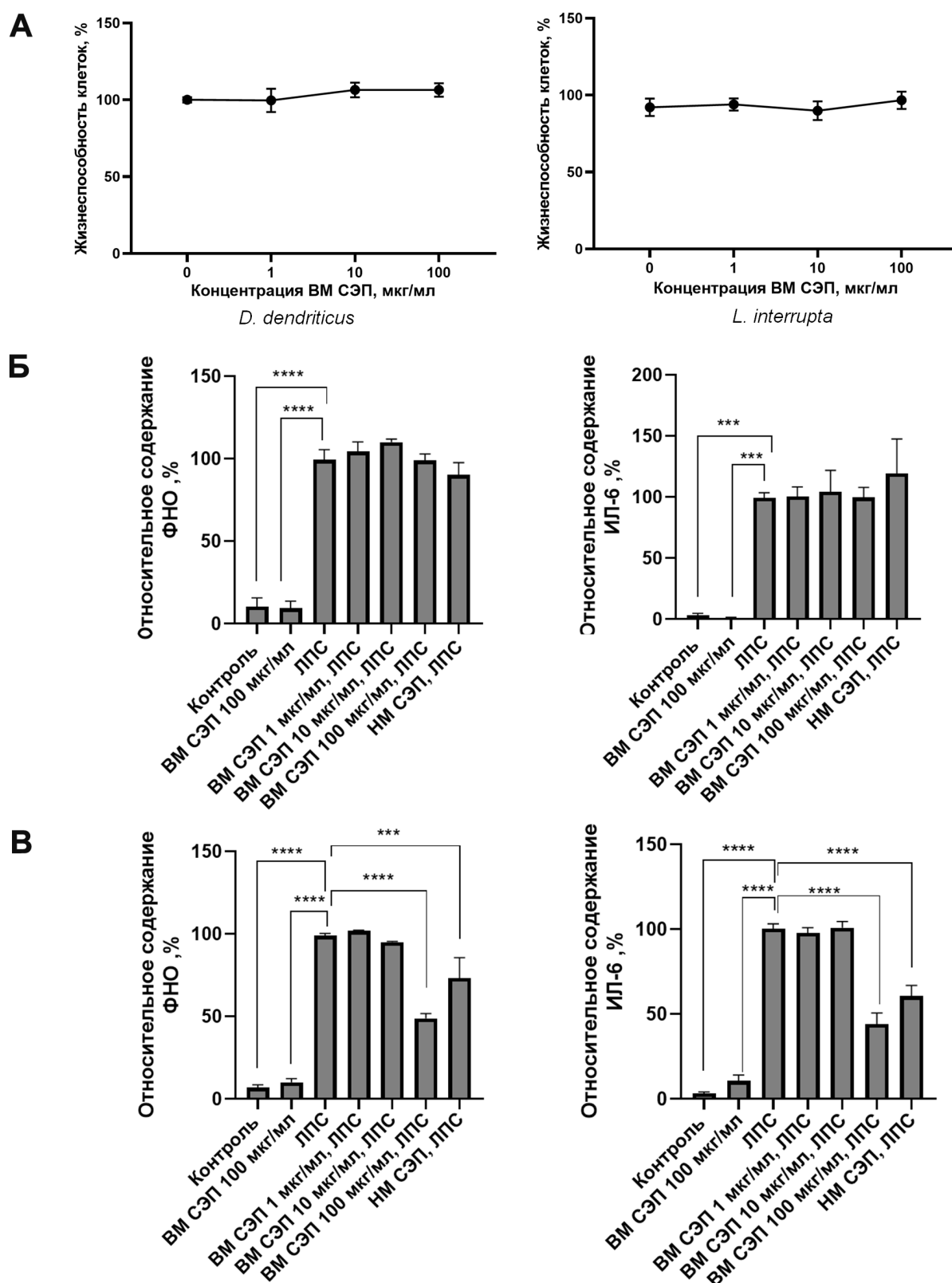


Рис. 1. Влияние высокомолекулярной (ВМ) и низкомолекулярной (НМ) фракций СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* на жизнеспособность и ЛПС-индуцированную активацию дифференцированных клеток ТНР-1. К дифференцированным клеткам добавляли высокомолекулярную фракцию (более 3 кДа) СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* или *L. interrupta* с добавлением белка в концентрации в диапазоне от 1 до 100 мкг/мл и низкомолекулярную фракцию (менее 3 кДа) в объеме 50 мкл на 1 мл среды на ночь. После этого проверяли жизнеспособность клеток или стимулировали воспалительную активацию клеток с помощью 100 нг/мл ЛПС в течение 3 ч. Воспалительную активацию оценивали по содержанию в среде культивирования цитокинов ФНО и ИЛ-6. **А** – Влияние СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* на жизнеспособность клеток. **Б** – Влияние высокомолекулярной и низкомолекулярной фракции СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* на содержание цитокинов ФНО и ИЛ-6. **В** – Влияние высокомолекулярной и низкомолекулярной фракции СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* на содержание цитокинов ФНО и ИЛ-6. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n \geq 3$). *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

фенотипом и секретирующий Th1-цитокины, в частности ФНО и ИЛ-6 [34, 35]. Считается, что паразиты и их СЭП могут оказывать противовоспалительный эффект, в частности, за счет подавления воспалительной активации макрофагов, а также стимуляции их поляризации по противовоспалительному фенотипу M2 [18, 19, 21, 22]. M2-макрофаги характеризуются противовоспалительными свойствами и секрецией Th2-цитокinov — в частности, ИЛ-4 и ИЛ-10 [35]. Для оценки противовоспалительного действия СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* на ЛПС-индуцированную активацию макрофагов, полученных из моноцитов ТНР-1, определяли концентрации Th1-цитокinov ФНО и ИЛ-6, а также Th2-цитокinov ИЛ-4 и ИЛ-10 в среде культивирования с помощью наборов для иммуноферментного анализа. Анализ результатов данного исследования показал, что предварительная инкубация дифференцированных клеток ТНР-1 с СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* в течение ночи не влияет на содержание в среде Th1-цитокinov ФНО и ИЛ-6, что свидетельствует об отсутствии действия СЭП на ЛПС-индуцированную активацию (рис. 1Б). В то же время, предварительная инкубация дифференцированных клеток ТНР-1 с СЭП от плероцеркоидов *L. interrupta* в концентрации 100 мкг/мл в течение ночи приводила к двукратному снижению содержания Th1-цитокinov ФНО и ИЛ-6 в среде культивирования в ходе ЛПС-индуцированной активации клеток, что свидетельствует о противовоспалительном эффекте (рис. 1В). Предобработка клеток с фракцией СЭП, содержащей молекулы размером менее 3 кДа, также приводила к снижению концентрации провоспалительных цитокinov ФНО и ИЛ-6 на 27% и 40% соответственно (рис. 1В). Стоит отметить, что концентрация Th2-цитокinov ИЛ-4 и ИЛ-10 в среде культивирования не превышала 20 пг/мл и не менялась под воздействием СЭП обоих видов цестод и ЛПС (данные не представлены).

Полученные результаты, в целом, свидетельствуют о том, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* обладают выраженным противовоспалительным эффектом в модели ЛПС-индуцированной активации макрофагов ТНР-1, в то время как СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* таким эффектом не обладают.

На следующем этапе нашего исследования мы протестировали СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* в модели каррагинан-индуцированного острого воспаления в «воздушном мешке» у самцов мышей линии C57Bl/6. В данной модели воспалительный процесс индуцируется под кожей экспериментальных животных путем инъекции каррагинана в подкожный «воздушный мешок», сформированный путем двукратного предварительного введения стерильного воздуха определенного объема в межлопаточную область [36]. Настоящая модель изучения

воспалительного процесса длительное время используется в экспериментальных исследованиях. Она была предложена в 1953 г. Гансом Селье и в настоящее время является одной из общепринятых моделей для тестирования противовоспалительных свойств различных веществ [37–39]. Нами было исследовано влияние СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* на объем лейкоцитарного инфильтрата и число клеток в нем, на содержание провоспалительных цитокinov ФНО и ИЛ-6, а также противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в очаге экспериментального воспаления.

Анализ результатов определения объема воспалительного экссудата показал, что предварительное введение как высокомолекулярной (более 3 кДа), так и низкомолекулярной фракции (менее 3 кДа) СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* в «воздушный мешок» мышам приводит к статистически значимому уменьшению объема воспалительного экссудата после стимуляции каррагинаном (рис. 2А). В то же время не было обнаружено значимого влияния СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* на число клеток, участвующих в воспалении, в 1 мл экссудата из «воздушного мешка» мышей (рис. 2Б). Полученные результаты могут свидетельствовать, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* снижают экссудацию и отек, но не влияют на привлечение лейкоцитов в очаг воспаления. Экссудация зависит, в первую очередь, от расширения сосудов. Вазодилатация регулируется, главным образом, оксидом азота и простагландинами PG12, PGD2, PGE2 и PGF2 [40]. Отек является следствием увеличения проницаемости стенки сосудов в очаге воспаления под действием гистамина, брадикинина, лейкотриенов, компонентов комплемента, вещества Р и фактора активации тромбоцитов, а также перехода артериальной гиперемии в смешанную и венозную при замедлении кровотока вследствие спровоцированных медиаторами воспаления тромбогенных нарушений [40]. Привлечение лейкоцитов в очаг воспаления регулируется главным образом цитокинами и хемокинами, в частности, ФНО [41].

Результаты определения цитокinov в очаге воспаления показали, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* не влияют на уровень провоспалительного цитокина ФНО (рис. 2В). Поскольку известно, что ФНО имеет критическое значение для миграции лейкоцитов в очаг воспаления, в частности, в модели «воздушного мешка» [41], отсутствие влияния СЭП на уровень ФНО может определять отсутствие влияния на миграцию лейкоцитов.

В то же время, и высокомолекулярная, и низкомолекулярная фракции СЭП увеличивают уровень цитокина ИЛ-6, в то время как каррагинан сам по себе не приводит к увеличению концентрации данного цитокина в «воздушном мешке» (рис. 2В). Интересно отметить, что ИЛ-6 играет

неоднозначную роль в воспалении и наряду с провоспалительными свойствами демонстрирует и противовоспалительные, в частности, в модели каррагинан-индуцированного плеврита у мышей. Так, предварительное введение ИЛ-6 за 5 мин до каррагинана в модели каррагинан-индуцированного плеврита у мышей приводило к снижению экссудации и миграции лейкоцитов. При этом введение антител к ИЛ-6 приводило к снижению притока лейкоцитов, но значительному увеличению экссудации. Эти данные свидетельствуют о том, что ИЛ-6 может оказывать ингибирующее влияние на процесс экссудации в модели воспаления, вызванного каррагинаном [42]. Повышение концентрации ИЛ-6 под действием СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* может лежать в основе его ингибирующего влияния на экссудацию.

Наряду с провоспалительным цитокином ФНО, каррагинан стимулирует небольшую продукцию противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (рис. 2В). При этом низкомолекулярная фракция СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* вызывает значимое увеличение уровня ИЛ-10 (рис. 2В). В модели каррагинан-индуцированного плеврита у мышей был продемонстрирован противовоспалительный эффект ИЛ-10 на ранней фазе каррагинан-индуцированного плеврита. Так, ИЛ-10 ингибировал как экссудацию, так и миграцию лейкоцитов через 4 ч после введения каррагинана. Введение же антител к ИЛ-10 приводило к увеличению как притока лейкоцитов, так и экссудации [42]. Противовоспалительный эффект ИЛ-10 был продемонстрирован и во многих других моделях воспаления [43, 44].

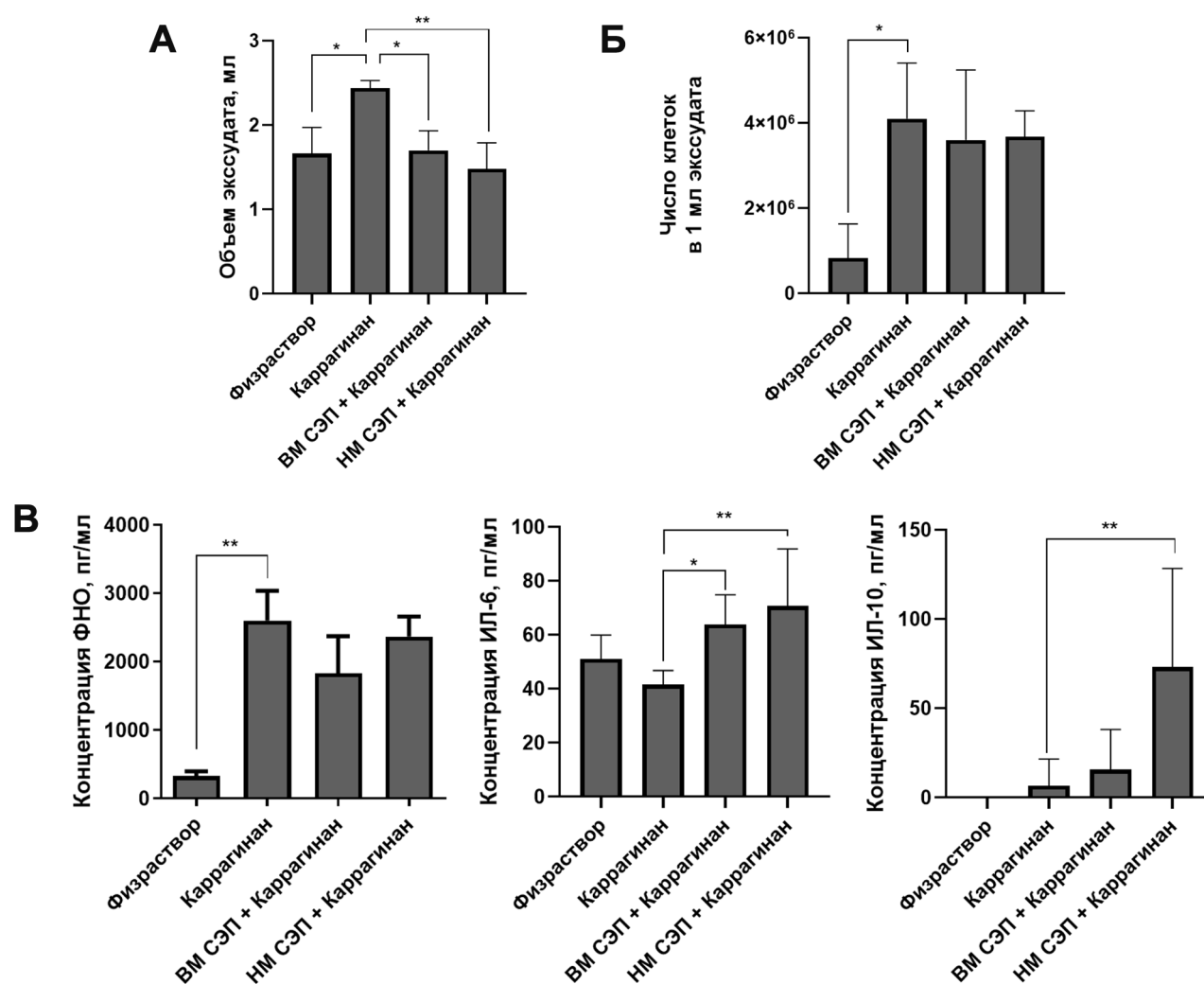


Рис. 2. Влияние высокомолекулярной (ВМ) и низкомолекулярной (НМ) фракций плероцеркоидов *L. interrupta* на каррагинан-индуцированное воспаление в «воздушном мешке» у мышей. За 24 ч до индукции воспаления в предварительно сформированный «воздушный мешок» мышам вводили 500 мкл СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* с добавлением белка в концентрации 100 мкг/мл (высокомолекулярная фракция больше 3 кДа) или аналогичный объем изомолекулярной фракции (менее 3 кДа). Через 24 ч в «воздушный мешок» вводили 1%-ный раствор каррагинана в 0,9%-ном NaCl. Через 4 ч из подкожного мешка забирали воспалительный экссудат, определяли его объем и содержание клеток в нем. В супернатанте определяли концентрацию цитокинов ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-10. Влияние СЭП плероцеркоидов на: **А** — объем экссудата. **Б** — концентрацию клеток в 1 мл экссудата. **В** — уровень цитокинов ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-10 в 1 мл экссудата. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 5$). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о противовоспалительном эффекте как высокомолекулярной, так и низкомолекулярной фракции СЭП плероцеркоидов *L. interrupta*. При этом низкомолекулярная фракция вызывает более выраженный эффект в модели *in vivo*, что делает ее более перспективной для дальнейших исследований. Противовоспалительный эффект СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* может быть связан как с прямым ингибирующим влиянием на активацию воспалительных макрофагов, как показано в модели ЛПС-индуцированной активации дифференцированных клеток ТНР-1, так и со стимуляцией продукции ИЛ-6 и ИЛ-10, первый из которых обладает антиэкссудативным свойством, а второй мощным противовоспалительным эффектом. В то же время точный механизм противовоспалительного действия СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* не выяснен и требует дальнейшего исследования. СЭП гельминтов представляет собой смесь из пептидов, углеводов, жиров и небольших органических молекул. В связи с этим поиск отдельных молекул, ответственных за противовоспалительный эффект СЭП, является нетривиальной и сложной задачей. Поскольку низкомолекулярная фракция СЭП лигулы вызвала более выраженный эффект в модели *in vivo*, усилив секрецию ИЛ-10, то дальнейший поиск стоит сосредоточить именно на малых молекулах СЭП лигулы. Известен ряд низкомолекулярных молекул гельминтов, продемонстрировавших терапевтический потенциал в лечении воспалительных и аутоиммунных заболеваний. К таким соединениям относят молекулы, содержащие фосфорилхолин, в частности гликопротеин ES-62 [45, 46] и тафтсин- фосфорилхолин [21, 22, 26–28], полисахарид лакто-N-фукопентоза III [47, 48], простагландин E2 [49], цистатин [20, 31, 50] и др. При

этом защитный эффект некоторых из этих соединений связан со стимуляцией секреции противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и с подавлением секреции ряда противовоспалительных цитокинов, а также со стимуляцией дифференцировки противовоспалительных M2-макрофагов и экспансии регуляторных Т- и В-клеток. В связи с этим можно предположить, что среди малых молекул в низкомолекулярной фракции СЭП лигулы могут присутствовать похожие молекулы.

Авторы выражают благодарность А.В. Елизову, А.В. Селиванову, А.Г. Попову, Д.П. Никонову (Байкальский специализированный участок по борьбе с болезнями рыб и других гидробионтов, Республика Бурятия), О.Б. Жепхоловой (Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук) за помощь в сборе материала. Оценка противовоспалительных свойств секреторно-экскреторных продуктов цестод в моделях ЛПС-индуцированной активации макрофагов ТНР-1 и каррагинан-индуцированного воспаления была проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №22-24-00341). Консультации по методике каррагинан-индуцированного воспаления были получены на биологическом факультете МГУ; поиск и анализ литературных источников, анализ полученных результатов и написание статьи были проведены в научно-исследовательском Институте физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены комиссией Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tahapary D.L., de Ruiter K., Martin I., van Lieshout L., Guigas B., Soewondo P., Djuardi Y., Wiria A.E., Mayboroda O.A., Houwing-Duistermaat J.J., Tasman H., Sartono E., Yazdanbakhsh M., Smit J.W., Supali T. Helminth infections and type 2 diabetes: a cluster-randomized placebo controlled SUGARSPIN trial in Nangapanda, Flores, Indonesia. *BMC Infect. Dis.* 2015;18(15):133.
2. Wammes L.J., Mpairwe H., Elliott A.M., Yazdanbakhsh M. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *Lancet Infect. Dis.* 2014;14(11):1150–1162.
3. Yazdanbakhsh M., Wahyuni S. The role of helminth infections in protection from atopic disorders. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005;5(5):386–391.
4. Hewitson J.P., Grainger J.R., Maizels R.M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2009;167(1):1–11.
5. Johnston M.J.G., MacDonald J.A., McKay D.M. Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. *Parasitology.* 2009;136(2):125–147.
6. Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D., Allen J.E. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol. Rev.* 2004;201(1):89–116.
7. Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 1998;84(1):74–81.
8. Reyes J.L., Lopes F., Leung G., Mancini N.L., Matisz C.E., Wang A., Thomson E.A., Graves N., Gilleard J., McKay D.M. Treatment with cestode parasite antigens results in recruitment of CCR2⁺ myeloid cells, the adoptive transfer of which ameliorates colitis. *Infect. Immun.* 2016;84(12):3471–3483.
9. Reyes J.L., Wang A., Fernando M.R., Graepel R., Leung G., van Rooijen N., Sigvardsson M., McKay D.M. Splenic B cells from *Hymenolepis diminuta*-infected mice

ameliorate colitis independent of T cells and via cooperation with macrophages. *J. Immunol.* 2015;194(1):364–378.

10. Matisz C.E., Faz-López B., Thomson E., Al Raja-bi A., Lopes F., Terrazas L.I., Wang A., Sharkey K.A., McKay D.M. Suppression of colitis by adoptive transfer of helminth antigen-treated dendritic cells requires interleukin-4 receptor- α signaling. *Sci. Rep.* 2017;7:40631.

11. Soufli I., Toumi R., Rafa H., Amri M., Labsi M., Khelifi L., Nicoletti F., Touil-Boukoffa C. Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice. *J. Inflamm.* 2015;12:19.

12. Kochneva A., Drozdova P., Borvinskaya E. The first transcriptomic resource for the flatworm *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda: Bothriocephalidea), a common parasite of holarctic freshwater fish. *Mar. Genomics.* 2020;51:100702.

13. Biserova N.M., Kuttyrev I.A., Malakhov V.V. The tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda) produces prostaglandin E₂, a regulator of host immunity. *Dokl. Biol. Sci.* 2011; 441(1):367–369.

14. Biserova N.M., Kuttyrev I.A., Jensen K. GABA in the nervous system of the cestodes *Diphyllobothrium dendriticum* (Diphyllobothriidea) and *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllidae), with comparative analysis of muscle innervation. *J. Parasitol.* 2014;100(4):411–421.

15. Biserova N.M., Kuttyrev I.A. Localization of prostaglandin E₂, γ -aminobutyric acid, and other potential immunomodulators in the plerocercoid *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Biol. Bull.* 2014;41(3):242–250.

16. Kuttyrev I.A., Biserova N.M., Olennikov D.N., Korneva J.V., Mazur O.E. Prostaglandins E₂ and D₂-regulators of host immunity in the model parasite *Diphyllobothrium dendriticum*: An immunocytochemical and biochemical study. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2017;212:33–45.

17. Kuttyrev I.A., Biserova N.M., Mazur O.E., Dugarov Z.N. Experimental study of ultrastructural mechanisms and kinetics of tegumental secretion in cestodes parasitizing fish (Cestoda: Diphyllobothriidea). *J. Fish. Dis.* 2021;44(8):1237–1254.

18. Bai X., Wu X., Wang X., Guan Z., Gao F., Yu J., Yu L., Tang B., Liu X., Song Y., Wang X., Radu B., Boireau P., Wang F., Liu M. Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* in vitro. *Mol. Cell Biochem.* 2012;360(1–2):79–88.

19. Wang Z., Hao C., Zhuang Q., Zhan B., Sun X., Huang J., Cheng Y., Zhu X. Excretory/secretory products from adult worms attenuated DSS-induced colitis in mice by driving PD-1-mediated M2 macrophage polarization. *Front. Immunol.* 2020;11:563784.

20. Li H., Qiu D., Yuan Y., Wang X., Wu F., Yang H., Wang S., Ma M., Qian Y., Zhan B., Yang X. *Trichinella spiralis* cystatin alleviates polymicrobial sepsis through activating regulatory macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2022;109:108907.

21. Blank M., Bashi T., Lachnisch J., Ben-Ami-Shor D., Shovman O., Fridkin M., Eisenstein M., Volkov A., Barshack I., Shoenfeld Y. Helminths-based bifunctional molecule, tuftsin-phosphorylcholine (TPC), ameliorates an established murine arthritis. *PLoS One.* 2018;13(8):e0200615.

22. Novikova N.S., Diatlova A.S., Derevtsova K.Z., Korneva E.A., Viktorovna T.V., Ostrinski Y., Abraham L.,

Quinn S., Segal Y., Churilov L.P., Blank M., Shoenfeld Y., Aharoni R., Amital H. Tuftsin-phosphorylcholine attenuate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2019;337:577070.

23. Maizels R.M., Hewitson J.P., Smith K.A. Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 2012. Vol.24(4):459–466.

24. McSorley H.J., Hewitson J.P., Maizels R.M. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* 2013;43(3–4):301–310.

25. Du L., Tang H., Ma Z., Xu J., Gao W., Chen J., Gan W., Zhang Z., Yu X., Zhou X., Hu X. The protective effect of the recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice. *Dig. Dis. Sci.* 2011;56(10):2810–2817.

26. Segal Y., Blank M., Shoenfeld Y. Tuftsin phosphorylcholine—a novel compound harnessing helminths to fight autoimmunity. *Immunol. Res.* 2018;66(6):637–641.

27. Ben-Ami Shor D., Lachnisch J., Bashi T., Dahan S., Shemer A., Segal Y., Shovman O., Halpert G., Volkov A., Barshack I., Amital H., Blank M., Shoenfeld Y. Immunomodulation of murine chronic DSS-induced colitis by tuftsin-phosphorylcholine. *J. Clin. Med.* 2019;9(1):65.

28. Neuman H., Mor H., Bashi T., Givol O., Watad A., Shemer A., Volkov A., Barshack I., Fridkin M., Blank M., Shoenfeld Y., Koren O. Helminth-based product and the microbiome of mice with lupus. *mSystems.* 2019;4(1):00160–18.

29. Wu Z., Wang L., Tang Y., Sun X. Parasite-derived proteins for the treatment of allergies and autoimmune diseases. *Front. Microbiol.* 2017;8:2164.

30. Nascimento Santos L., Carvalho Pacheco L.G., Silva Pinheiro C., Alcantara-Neves N.M. Recombinant proteins of helminths with immunoregulatory properties and their possible therapeutic use. *Acta Trop.* 2017;166:202–211.

31. Khatri V., Chauhan N., Kalyanasundaram R. Parasite cystatin: immunomodulatory molecule with therapeutic activity against immune mediated disorders. *Pathogens.* 2020;9(6):431.

32. Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 2015;15:577.

33. Długosz E., Basała K., Zawistowska-Deniziak A. Cytokine production and signalling in human THP-1 macrophages is dependent on *Toxocara canis* glycans. *Parasitol. Res.* 2019;118(10):2925–2933.

34. Fleetwood A.J., Lawrence T., Hamilton J.A., Cook A.D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol.* 2007;178(8):5245–5252.

35. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 2012;122(3):787–795.

36. Duarte D.B., Vasko M.R., Fehrenbacher J.C. Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2016;72(1):5.6.1–5.6.9.

37. Eteraf-Oskouei T., Mikaily Mirak S., Najafi M. Anti-inflammatory and anti-angiogenesis effects of verapamil on rat air pouch inflammation model. *Adv. Pharm. Bull.* 2017;7(4):585–591.

38. Fehrenbacher J.C., McCarsen K.E. Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Curr. Protoc.* 2021;1(8):e183.

39. Inada T., Kamibayashi T. Protective effect of the intravenous anesthetic propofol against a local inflammation in the mouse carrageenan-induced air pouch model. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2021;43(1):100–104.
40. Sherwood E.R., Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2004;18(3):385–405.
41. Romano M., Faggioni R., Sironi M., Sacco S., Echtenacher B., Di Santo E., Salmons M., Ghezzi P. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. *Mediators Inflamm.* 1997;6(1):32–38.
42. Fröde T.S., Souza G.E.P., Calixto J.B. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine.* 2002;17(3):149–156.
43. Shouval D.S., Biswas A., Goettel J.A., et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity.* 2014;40(5):706–719.
44. Saraiva M., Vieira P., O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* 2020;217(1):e20190418.
45. Goodridge H.S., McGuinness S., Houston K.M., Egan C.A., Al-Riyami L., Alcocer M.J., Harnett M.M., Harnett W. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol.* 2007;29(3):127–137.
46. Harnett M.M., Kean D.E., Boitelle A. The phosphorylcholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67(4):518–523.
47. Velupillai P., Harn D.A. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosoma-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(1):18–22.
48. Zhu B., Trikudanathan S., Zozulya A.L., Sandoval-Garcia C., Kennedy J.K., Atochina O., Norberg T., Castagner B., Seeberger P., Fabry Z., Harn D., Khoury S.J., Guleria I. Immune modulation by lacto-N-fucopentose III in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Immunol.* 2012;142(3):351–361.
49. Laan L.C., Williams A.R., Stavenhagen K., Giera M., Kooij G., Vlasakov I., Kalay H., Kringel H., Nejsum P., Thamsborg S.M., Wührer M., Dijkstra C.D., Cummings R.D., van Die I. The whipworm (*Trichuris suis*) secretes prostaglandin E2 to suppress proinflammatory properties in human dendritic cells. *FASEB J.* 2017;31(2):719–731.
50. Chantree P., Tarasuk M., Prathaphan P., Ruangtong J., Jamklang M., Chumkiew S., Martviset P. Type I cystatin derived from *Fasciola gigantica* suppresses macrophage-mediated inflammatory responses. *Pathogens.* 2023;12(3):395.

Поступила в редакцию 12.05.2023

После доработки 28.07.2023

Принята в печать 21.08.2023

RESEARCH ARTICLE

Investigation of excretory/secretory products from gull-tapeworm *Dibothriocephalus dendriticus* and ligula *Ligula interrupta* plerocercoids anti-inflammatory properties

A.N. Pavlyuchenkova^{1, 2} , I.A. Kutyrev^{1, *} , A.V. Fedorov³ ,
M.A. Chelombitko² , O.E. Mazur¹ , Z.N. Dugarov¹ 

¹Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Sakhyanovoy str. 6, Ulan-Ude, 670047, Russia;

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russia;

³Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: ikutyrev@yandex.ru

In this work, the anti-inflammatory potential of secretory-excretory products (SEP) of gull-tapeworm *Dibothriocephalus dendriticus* and ligula *Ligula interrupta* plerocercoids was studied for the first time in an *in vitro* model of LPS-induced activation of macrophages. A monocyte cell line derived from a patient with acute monocytic leukemia, THP-1, was used as a macrophage model. The anti-inflammatory properties of SEP were determined by the content of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 cytokines in the incubation medium using commercial kits for enzyme immunoassay. The results of our study indicated that SEP from *L. interrupta* plerocercoids have a pronounced anti-inflammatory effect, while SEP from *D. dendriticus* plerocercoids did not have such an effect. Next, we investigated the anti-inflammatory properties of *L. interrupta* SEP in a carrageenan-induced air-sac inflammation model in mice. A significant decrease in the volume of inflammatory exudate under the

influence of *L. interrupta* SEP was found, as well as an increase in the level of the interleukin-6 cytokine. At the same time, SEP of *L. interrupta* had no effect on the number of cells per 1 ml of exudate, as well as on the level of the pro-inflammatory cytokine TNF. The low molecular weight fraction of *L. interrupta* SEP also increased the level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which indicates a more pronounced anti-inflammatory effect compared to the high molecular weight fraction. The results obtained, in general, indicate the anti-inflammatory properties of the SEP of *L. interrupta* plerocercoids. However, the mechanism of anti-inflammatory action has not been elucidated and requires further research.

Keywords: gull-tapeworm, *D. dendriticus*, *ligula*, *L. interrupta*, macrophages, inflammation, parasitic worms

Funding: The research was supported by Russian Science Foundation, project number 22-24-00341.

Сведения об авторах

Павлюченкова Анастасия Никитична — науч. сотр. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов института общей и экспериментальной биологии СО РАН; 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>

Кутырев Иван Александрович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Тел.: 8-3012-43-42-25; e-mail: ikutyrev@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1119-6267>

Федоров Артем Валерьевич — науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-17-94; e-mail: artawe@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1741-3330>

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>

Мазур Ольга Евгеньевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Тел.: 8-3012-43-42-25; e-mail: olmaz33@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2676-3252>

Дугаров Жаргал Нимаевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Тел.: 8-3012-43-42-25; e-mail: zhar-dug@biol.bscnet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1264-5394>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.345

Оценка первичных реакций фотосинтеза в индивидуальных клетках микроводорослей микрофлуориметрическим методом**А.А. Волгушева¹ , И.В. Конюхов¹ , Т.К. Антал^{2,*}** ¹*Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Лаборатория комплексных экологических исследований, Псковский государственный университет, Россия, 180000, г. Псков, пл. Ленина, д. 2***e-mail: taras_an@mail.ru*

Регистрация кривых световой индукции флуоресценции хлорофилла высокого разрешения (т.н. ОЛР-кривых) широко используется для оценки первичных реакций фотосинтеза фототрофных организмов. Современные флуоресцентные методы в совокупности с методами микроскопии предоставляют перспективную возможность регистрации ОЛР-кривых на индивидуальных водорослевых клетках, что позволяет исследовать механизмы адаптации микроводорослей к стрессовым воздействиям, сопровождающиеся реорганизацией структуры популяции. В данной работе мы впервые охарактеризовали ОЛР-кривые, полученные на индивидуальных водорослевых клетках с помощью оригинального микрофлуориметра, и сравнили их с кривыми, снятыми традиционно в суспензиях микроводорослей. По результатам исследования предложены метод анализа ОЛР-кривых индивидуальных клеток микроводорослей, а также пути дальнейшего улучшения микрофлуориметрического метода.

Ключевые слова: фотосинтез, ОЛР-кривые, ЛР-тест, флуоресценция хлорофилла, микрофлуориметрия, микроводоросли

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-4

Введение

Фотосинтетическая активность является одним из ключевых показателей состояния фототрофных микроорганизмов, который широко используется при изучении ответных реакций организма на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды. Обычно для оценки фотосинтетической активности лабораторных культур микроводорослей или фитопланктонных сообществ используются методы измерения скорости фотообразования кислорода и/или поглощения двуокси углерода [1–3]. Данные методы достаточно трудоемки, особенно в полевых условиях, и требуют дополнительного определения биомассы или содержания хлорофилла (Хл). Поэтому в качестве альтернативы прямым методам получили распространение оптические методы измерения сигнала быстрой флуоресценции хлорофилла (ФХ) [4–5]. Данный подход базируется на способности Хл испускать кванты света (флуоресцировать) во время освещения. При этом выход ФХ связан с эффективностью использования световой энергии в первичных реакциях фотосинтеза, связанных с восстановлением НАДФ⁺

и синтезом АТФ для энергетического обеспечения цикла Кальвина.

Среди наиболее популярных методов измерения ФХ на сегодняшний день – методы РАМ (Pulse Amplitude Modulation, амплитудно-импульсная модуляция) и методы регистрации кинетических кривых световой индукции и темновой релаксации быстрой ФХ высокого разрешения [6–8]. Среди последних наиболее распространен метод регистрации кривой световой индукции ФХ – т.н. ОЛР-кривой, которая отражает, в основном, процесс восстановления фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) на свету высокой интенсивности [9]. Плотность потока фотонов (ППФ) фотосинтетически активной радиации при регистрации ОЛР-кривой обычно не превышает 10 тыс. мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹.

Типичная ОЛР-кривая отражает рост выхода ФХ от минимального значения F₀ (точка О на кривой) в адаптированном к темноте состоянии, когда фотосинтетическая ЭТЦ находится в окисленном состоянии, до максимального уровня F_М (пик Р), когда переносчики электронов переходят в полностью восстановленное состояние. Наличие трех фаз

роста выхода флуоресценции — ОJ (~5–40 мкс — 2–3 мс), JI (2–3 мс — 20–30 мс) и IP (20–30 мс — 100–300 мс) — отражает три последовательных процесса индукции фотосинтетического электронного транспорта. ОJ-фаза (т.н. фотохимическая фаза) зависит от интенсивности возбуждающего света и характеризуется восстановлением акцепторной стороны фотосистемы 2 (ФС2): хинонных акцепторов Q_A и Q_B [10]. Считается, что последующий за точкой J рост выхода ФХ обусловлен дополнительным восстановлением акцепторной стороны ФС2, пула пластохинонов (пул ПХ), увеличением энергизации тилакоидных мембран и конформационными изменениями ФС2 [8, 11, 12].

В последнее время получают распространение методы измерения ФХ, позволяющие оценивать состояние индивидуальных клеток фототрофных микроорганизмов. Это дает возможность активно изучать механизмы адаптации популяции микроводорослей к действию стрессовых факторов за счет реорганизации структуры популяции. Данный адаптационный механизм основан на высокой генетической вариабельности одноклеточных организмов, что позволяет им выживать даже в экстремальных условиях. Ранее для оценки фотосинтетической активности индивидуальных водорослевых клеток было предложено использовать метод РАМ в комбинации с микроскопом [13]. В значительно меньшей степени разработаны методы регистрации ОJIP-кривых на индивидуальных клетках.

Недавно на кафедре биофизики биологического факультета МГУ был разработан микрофлуориметр, позволяющий снимать ОJIP-кривые на индивидуальных клетках микроводорослей [14]. Предложенный авторами анализ ОJIP-кривых основан на определении величины максимальной переменной ФХ (F_V) и базовых показателей первичных реакций фотосинтеза: максимального квантового выхода фотохимического преобразования световой энергии в ФС2 (параметр F_V/F_M) и эффективности фотохимического преобразования световой энергии в ФС2 на актиничном свете (F_V'/F_M'). Данные показатели позволяют определять долю центров ФС2 в клетке, способных к фотохимическому преобразованию энергии. С помощью разработанного метода были выявлены клетки зеленой микроводоросли *Chlorella sorokiniana*, сохраняющие высокую фотохимическую активность и жизнеспособность в присутствии сильного токсиканта, вызывающего гибель до 98% клеток [15].

Многофазная ОJIP-кривая позволяет определять кроме параметров фотохимической активности ФС2 также другие важные параметры фотосинтетического электронного транспорта — в частности, эффективность переноса электрона с ФС2 в пул ПХ [16]. В данной работе мы впервые охарактеризовали ОJIP-кривые, полученные на

индивидуальных клетках зеленых и диатомовых микроводорослей, и предложили оценивать квантовый выход электронного транспорта в ФС2 для более полного анализа первичных реакций фотосинтеза.

Материалы и методы

Культивирование микроводорослей. В качестве объектов исследования использовали культуры зеленых (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii*) и диатомовых (*Gomphonema parvulum*, *Sellaphora* sp.) микроводорослей. Диатомовые водоросли и *S. quadricauda* выращивали на среде BG11 [17]. При выращивании диатомовых водорослей в стандартную среду BG11 дополнительно добавляли $Na_2SiO_3 \times 9H_2O$ в концентрации $0,030 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и витамины B1 и B12 ($5 \cdot 10^{-7} \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$). *C. reinhardtii* выращивали на минеральной среде HS [18]. Культуры микроводорослей растили в конических колбах Эрленмейера объемом 100 мл на шейкере при скорости перемешивания 120 об. мин^{-1} и температуре 25°C . Режим освещения составлял 10 ч освещения (ППФ $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и 14 ч темноты. Культуры выращивали в течение 3 сут, финальная концентрация Хл составляла $\sim 3 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Культивирование *C. reinhardtii* на среде без серы. Для создания условий серного голодания клетки *C. reinhardtii*, выращенные на полной среде HS, помещали на среду HS без серы, в которой сульфат был заменен эквимоллярным количеством хлорида. Протокол переноса клеток на среду без серы заключался в осаждении культуры путем центрифугирования (3000 г , 5 мин) и последующим ресуспендированием в среде HS без серы. Эту процедуру повторяли три раза. Контрольные клетки осаждали и ресуспендировали в полной среде HS три раза. После этого 10 мл культуры с концентрацией Хл $3\text{--}4 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ помещали в конические колбы Эрленмейера объемом 100 мл и инкубировали в тех же условиях, которые использовались при выращивании культур.

Регистрация и анализ ОJIP-кривых. ОJIP-кривые в суспензии микроводорослей регистрировали с помощью флуориметра «Portable spectral and fluorescence kinetic system» (PSFKS) [15], разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ и в лаборатории комплексных экологических исследований Псковского государственного университета. Источником возбуждения ФХ служил синий свет с максимумом при 445 нм и ППФ $7500 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Перед измерением клетки выдерживали в темноте в течение 3 мин. Индукционную кривую регистрировали в каждом образце с 10 техническими повторностями и последующим усреднением.

Регистрацию ОJIP-кривых на индивидуальных клетках микроводорослей проводили с помощью разработанного на кафедре биофизики био-

логического факультета МГУ микрофлуориметра как описано ранее [14, 15]. Перед измерением в суспензионную культуру микроводорослей добавляли 0,3% спирта для обездвиживания клеток, адаптировали их 3 мин к темноте, а затем помещали в камеру Горяева. На одной клетке снимали 10 индукционных кривых. Для анализа ОИР-кривых использовали параметры JIP-теста [16] приведенные в табл. 1.

Результаты

На рис. 1 приведены нормированные ОИР-кривые, полученные в суспензиях и на индивидуальных клетках зеленых микроводорослей *S. quadricauda* (рис. 1А) и *C. reinhardtii* (рис. 1Б) и диатомовых микроводорослей *G. parvulum* (рис. 1В) и *Sellaphora* sp. (рис. 1Г). Из рисунка видно, что форма кривых в суспензиях и на клетках

Таблица 1

Список параметров флуоресценции, а также формул используемых в JIP-тесте и объяснения к ним [16]

Измеряемые параметры флуоресценции	
F_0	Интенсивность ФХ при 50 мкс
F_J	Интенсивность ФХ при 2 мс
F_I	Интенсивность ФХ при 20 мс
$F_P(=F_M)$	Максимальный выход ФХ
Параметры JIP-теста	
$F_V = F_M - F_0$	Максимальная переменная ФХ
$V_J = (F_J - F_0) / F_V$	Относительная амплитуда фазы O-J
$V_I = (F_I - F_J) / F_V$	Относительная амплитуда фазы J-I
$TR_0 / ABS = F_V / F_M = (F_M - F_0) / F_M$	Максимальный квантовый выход фотохимического преобразования энергии в ФС2
$1 - V_J = 1 - ((F_J - F_0) / F_V)$	Эффективность переноса электрона с ФС2 в пул ПХ
$ET_0 / ABS = (F_V / F_M) \times (1 - V_J)$	Максимальный квантовый выход электронного транспорта в ФС2.

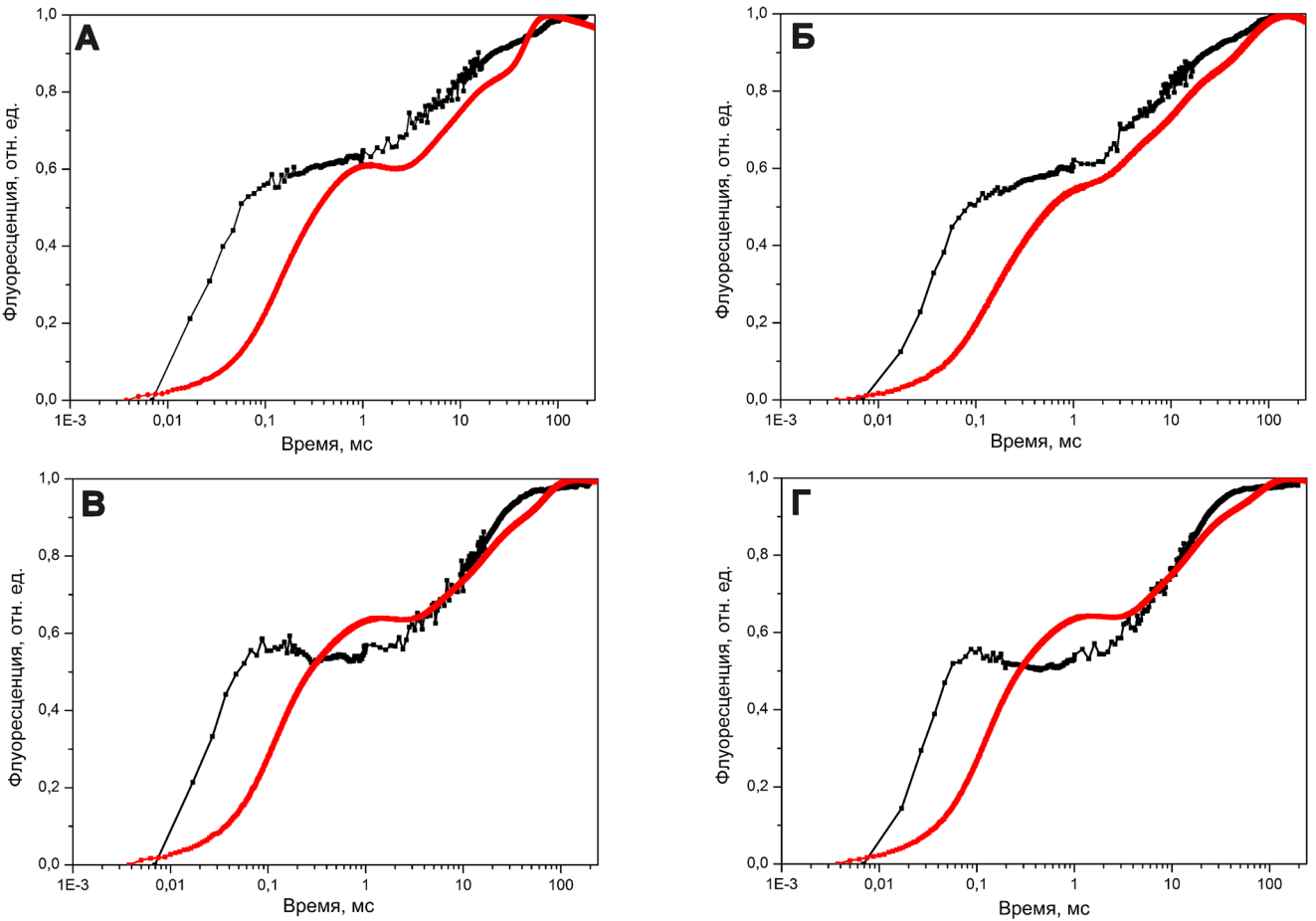


Рис. 1. ОИР-кривые, измеренные в клеточных суспензиях (красный цвет) и на индивидуальных клетках (черный цвет) зеленых микроводорослей – *S. quadricauda* (А), *C. reinhardtii* (Б) и диатомовых микроводорослей – *G. parvulum* (В) и *Sellaphora* sp. (Г). Кривые нормированы на максимальную величину переменной ФХ (амплитуда ОИР).

в целом соответствует типичной для микроводорослей ОЛР-кривой, выявляя основные стадии роста выхода ФХ. Для удобства сравнения кривых их нормировали на величину максимальной переменной ФХ (F_v). Основным отличием кривых у индивидуальных клеток являлось наличие более быстрого начального роста выхода ФХ (фаза ОJ), чем у кривых, полученных для суспензий. Это достигалось за счет отсутствия лаг-фазы, предшествующей быстрому нарастанию ФХ. Более того, на ОЛР-кривых у индивидуальных клеток диатомовых водорослей визуально не проявлялась точка перегиба I и, соответственно, фаза IP. Необходимо отметить, что фаза IP также была подавлена на кривых ОЛР у индивидуальных клеток зеленых водорослей.

В табл. 2 приведены рассчитанные с помощью ОЛР-кривых, показанных на рис. 1, значения F_v/F_m , $(1-V_j)$ и ETo/ABS. Результаты, полученные на индивидуальных клетках четырех культур микроводорослей, характеризовались заниженными (на 10–15%) значениями F_v/F_m по сравнению с этими показателями для суспензий. В то же время величина параметра $1-V_j$ была примерно на 20% выше у индивидуальных клеток диатомовых водорослей по сравнению с суспензиями. Величина ETo/ABS составила у зеленых микроводорос-

лей 0,25 (*S. quadricauda*) и 0,29 (*C. reinhardtii*) у индивидуальных клеток, 0,29 (*S. quadricauda*) и 0,33 (*C. reinhardtii*) – в суспензиях. У диатомовых микроводорослей величина ETo/ABS составила 0,27 (*G. parvulum*) и 0,29 (*Sellaphora* sp.) у индивидуальных клеток. Сравнимые значения получили при измерениях в суспензиях: 0,26 (*G. parvulum*) и 0,27 (*Sellaphora* sp.).

В табл. 2 также показано влияние 24-часовой инкубации культуры *C. reinhardtii* на среде без серы на параметры ФХ. Стрессовое воздействие индуцировало снижение параметров ФХ F_v/F_m и $1-V_j$ на 17% и 16% соответственно (при измерениях в суспензиях), на 22% и 15% соответственно (при измерениях на индивидуальных клетках). Квантовый выход электронного транспорта в ФС2 (ETo/ABS) снижался на 32% и 30% при измерениях в суспензиях клеток и на индивидуальных клетках соответственно.

Регистрация ОЛР-кривых в репрезентативной выборке индивидуальных клеток (не менее 100 клеток в каждой культуре) позволила получить распределение значений F_v/F_m и $1-V_j$ в популяциях контрольной и голодающей по сере культуры *C. reinhardtii* (рис. 2). В контроле примерно 70% клеток характеризовались высокими значениями F_v/F_m в интервале от 0,6 до 0,7, а оставшаяся

Таблица 2

Параметры ЛР-теста, рассчитанные на основе данных флуоресценции, полученных из ОЛР-кривых, приведенных на рис. 1

Культура	Индивидуальные клетки			Суспензии клеток		
	F_v/F_m	$1-V_j$	ETo/ABS	F_v/F_m	$1-V_j$	ETo/ABS
<i>S. quadricauda</i>	0,66 ± 0,08	0,37 ± 0,10	0,25 ± 0,08	0,73 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,29 ± 0,02
<i>C. reinhardtii</i>	0,65 ± 0,06	0,43 ± 0,05	0,28 ± 0,05	0,77 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,33 ± 0,01
<i>C. reinhardtii</i> (-S)*	0,51 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,19 ± 0,09	0,64 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,23 ± 0,01
<i>G. parvulum</i>	0,65 ± 0,09	0,43 ± 0,06	0,27 ± 0,04	0,76 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,26 ± 0,01
<i>Sellaphora</i> sp.	0,67 ± 0,07	0,44 ± 0,06	0,29 ± 0,04	0,76 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,27 ± 0,03

Примечание: *(-S) – культуры *C. reinhardtii* инкубировали 24 ч на среде без серы

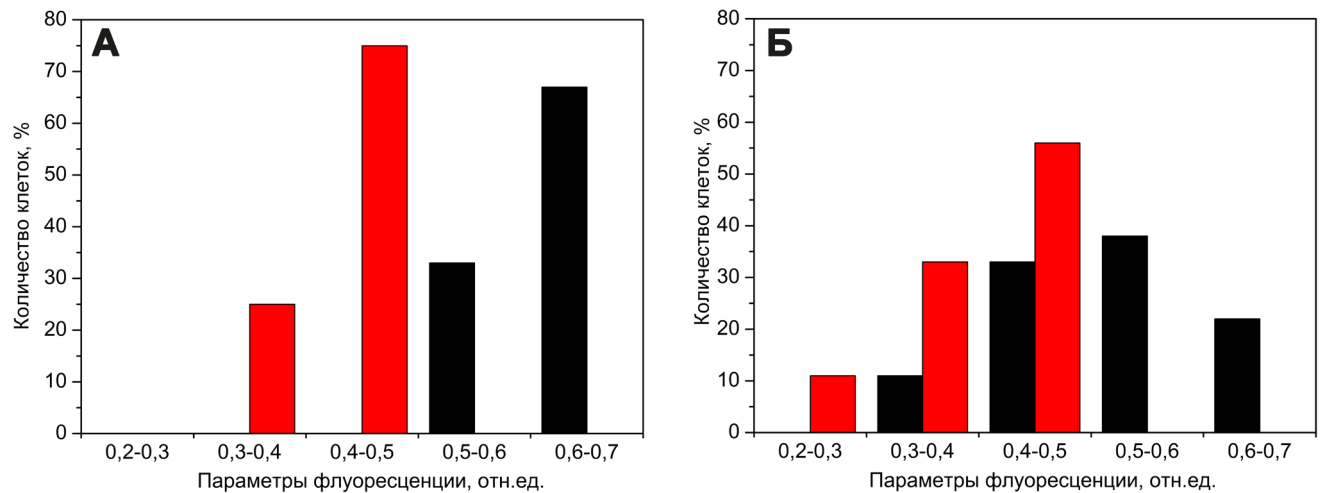


Рис. 2. Распределение параметров ФХ F_v/F_m (черный цвет) и $1-V_j$ (красный цвет) в контрольной культуре *C. reinhardtii* (А) и через 24 ч инкубации без серы (Б). Параметры рассчитаны на основе данных флуоресценции полученных из ОЛР-кривых, снятых на индивидуальных клетках с помощью микрофлуориметра. Выборка для каждой культуры составляла не менее 100 клеток.

часть клеток — значениями в интервале 0,5–0,6. Распределение $1-V_j$ в контрольной культуре носило сходный характер: большая часть клеток (около 75%) характеризовалась высокими значениями в интервале 0,4–0,5, а оставшиеся клетки — значениями в интервале 0,3–0,4. Дефицит серы в среде индуцировал появление дополнительных фракций клеток с низкими значениями этих параметров. Так, доля фракции с высокими значениями F_v/F_m (0,6–0,7) снижалась с 70% в контроле до 20% в голодающих клетках, а доля фракции со значениями F_v/F_m от 0,5 до 0,6 возрастала с 30% до 36%. Доли новых фракций с низкими значениями F_v/F_m составляли 34% в интервале 0,4–0,5 и 10% в интервале 0,3–0,4. Влияние дефицита серы на распределение параметра $1-V_j$ было менее выражено по сравнению с влиянием на F_v/F_m . Так, около 60% голодающих клеток сохраняли значения $1-V_j$ выше 0,4, 33% клеток характеризовались значениями от 0,3 до 0,4, а 10% клеток — от 0,2 до 0,3.

Обсуждение

На сегодняшний день в литературе отсутствует описание ОЛР-кривых, полученных у индивидуальных водорослевых клеток. Проведенное нами сравнение ОЛР-кривых у индивидуальных клеток и в клеточных суспензиях зеленых и диатомовых микроводорослей обнаружило ряд особенностей формы кривых у индивидуальных клеток, которые определялись, прежде всего, различиями в интенсивности возбуждающего света в двух используемых флуориметрах. Так, измерения в суспензиях проводились при максимально возможной для прибора PSFKS интенсивности света — ППФ 7500 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, в то время как в микрофлуориметре ППФ была в два раза выше: 15000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Столь высокая интенсивность света необходима для увеличения общего выхода ФХ и, соответственно, снижения шума, возникающего из-за низкого сигнала от отдельной клетки.

Высокая интенсивность возбуждающего света в микрофлуориметре являлась наиболее вероятной причиной занижения выхода переменной ФХ при измерениях на индивидуальных клетках и занижения величины F_v/F_m на 10–15% по сравнению с результатами измерений в суспензиях клеток (табл. 2). Данный эффект может быть обусловлен быстрым развитием нефотохимического тушения в результате высокой энергизации тилакоидных мембран, приводящего к занижению выхода ФХ, особенно во время последней стадии IP. Действительно, на ОЛР-кривых у индивидуальных клеток зеленых микроводорослей фаза IP была подавлена, а у диатомовых микроводорослей не проявлялась совсем (рис. 1). В пользу того, что причиной подавления фазы IP может быть нефотохимическое тушение, говорит тот факт, что

у некоторых диатомовых микроводорослей, обладающих интенсивным нефотохимическим тушением, практически отсутствует фаза IP при измерениях в суспензии клеток. Однако она проявляется после обработки культуры ионофором валиномицином [19].

Известно, что скорость роста ФХ во время фазы OJ зависит от интенсивности возбуждающего света [9]. При регистрации ОЛР-кривых на индивидуальных клетках быстрый рост ФХ начинался всего через 7–8 мкс после начала освещения, и фаза OJ имела экспоненциальную форму, в то время как при измерениях в суспензиях быстрый рост ФХ наблюдался через 40–50 мкс после начала освещения, при этом фаза OJ характеризовалась сигмоидной формой (рис. 1). Данное наблюдение подтверждает предположение о существенном влиянии фактора интенсивности возбуждающего света на форму кривых ОЛР у индивидуальных клеток.

В гидробиологических и экологических исследованиях флуоресцентные методы обычно используются для определения базовой характеристики фотосинтеза — максимального квантового выхода фотохимического преобразования энергии в ФС2 (F_v/F_m) [4, 5, 20, 21]. Данная характеристика отражает самый первый этап конверсии энергии экситона в антенне ФС2 в энергию разделенных зарядов $P_{680}^+Q_A^-$. Последующим важнейшим этапом фотосинтеза является перенос электрона с ФС2 в пул ПХ. Этот процесс зависит от функционального состояния кислород-выделяющего комплекса и акцепторной стороны ФС2, на которое оказывают влияние стрессовые факторы [22, 23]. Необходимо отметить, что ингибирование акцепторной стороны ФС2 — например, диуроном — приводит к полной блокировке фотосинтетического электронного транспорта и фотосинтеза в целом, при этом величина F_v/F_m практически не изменяется. В связи с этим на практике возможны ситуации — в частности, при загрязнении природных водоемов гербицидами — когда наблюдаемые значения F_v/F_m у фитопланктона не позволяют выявить ингибирование фотосинтеза.

Ранее Р. Штрассер предложил метод анализа ОЛР-кривых (JIP-тест) на базе модели, допускающей, что форма кривой отражает трехстадийный процесс восстановления Q_A в ФС2 [16]. В настоящее время предложенная модель является весьма популярной, хотя и подвергается справедливой критике, поскольку в ней не учитывается влияние на выход ФХ электрохимического потенциала на тилакоидной мембране и конформационных изменений в ФС2 [11, 12]. Тем не менее, ключевые параметры JIP-теста находят эмпирическое подтверждение. Одним из таких параметров является $1-V_j$, который отражает эффективность переноса электрона с Q_A в пул ПХ. Данный параметр характеризуется высокой чувствительностью к воздействиям, влияющим на электронный транспорт на

донорной и акцепторной стороне ФС2 [16]. Параметры $1-V_j$ и F_v/F_m позволяют определить квантовый выход электронного транспорта в ФС2 (ЕТо/ABS), который характеризует конверсию экситона в антенне ФС2 в электрон, перенесенный в пул ПХ. Значения ЕТо/ABS варьировали в диапазоне от 0,25 до 0,29 при измерениях на индивидуальных клетках и от 0,26 до 0,33 при измерениях в суспензиях (табл. 2), указывая на некоторые различия в эффективности первичных реакций фотосинтеза у разных культур микроводорослей и незначительное занижение этого параметра при измерениях на индивидуальных клетках.

Механизмы адаптации микроводорослей к стрессу включают множественные процессы реорганизации метаболических процессов, ультраструктуры клетки и структуры популяции [24, 25]. Обычно для исследования адаптационных процессов оценивают усредненные по культуре физиологические и другие показатели, не учитывая их вариации по популяции. Однако гетерогенность популяции по физиологическим характеристикам может обеспечивать ее восстановление после снижения стрессового давления. Анализ ОЖР-кривых индивидуальных клеток микроводорослей может быть использован для изучения распределения ключевых показателей фотосинтетической активности в популяции микроводорослей в условиях стресса [15].

Дефицит минерального питания является наиболее актуальным стрессом для природного фитопланктона. Влияние недостатка серы на функциональное состояние фотосинтетического аппарата и ОЖР-кривые хорошо изучено в связи со способностью некоторых микроводорослей продуцировать водород [26, 27]. Данный стресс индуцирует множественные изменения фотосинтетического аппарата – в частности, снижение количества фотохимически активных центров ФС2, нарушение линейного электронного транспорта в хлоропласте и быструю инактивацию цикла Кальвина. В данной работе мы изучили влияние дефицита серы на распределение F_v/F_m и $1-V_j$ в культуре *C. reinhardtii*. Стрессовые условия при-

водили к увеличению гетерогенности популяции по данным параметрам, отражая разделение популяции на фракции толерантных и чувствительных к стрессу клеток. Параметры F_v/F_m и $1-V_j$ характеризовались сходным распределением в контроле, однако в условиях дефицита серы проявлялись различия (рис. 2). Так, параметр $1-V_j$ характеризовался более высокой стабильностью в условиях стресса по сравнению с F_v/F_m , поскольку в популяции оставалась существенная доля клеток с высокими, как в контроле, значениями $1-V_j$. Данный результат указывает на то, что снижение активности первичных реакций фотосинтеза в условиях дефицита серы происходило, в основном, в результате снижения содержания фотохимически активных центров ФС2 в клетке, а снижение эффективности электронного транспорта на акцепторной стороне фотохимически активных центров ФС2 было незначительным.

Заключение

Измерение ОЖР-кривых индивидуальных клеток фитопланктона открывает перспективу исследования механизмов реорганизации структуры сообщества фототрофных микроорганизмов для обеспечения выживания в условиях стресса. Для анализа ОЖР-кривых, зарегистрированных на индивидуальных клетках, мы предлагаем использовать эмпирически верифицированные параметры ФХ: F_v/F_m и $1-V_j$, которые позволяют оценить квантовый выход электронного транспорта в ФС2. Дальнейшее улучшение технических качеств представленного в работе микрофлуориметра, прежде всего – повышение чувствительности детектора ФХ и снижение интенсивности возбуждающего света – позволит более точно оценивать активность первичных реакций фотосинтеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-24-00353). Исследования проведены без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bender M.L., Grande K.D., Johnson K.M., Marra J.F., Williams P.J., Sieburth J.M., Pilson M.E., Langdon C., Hitchcock G.L., Orchardo J., Hunt C.P., Donaghay P.L., Heinemann K. A comparison of four methods for determining planktonic community production 1. *Limnol. Oceanogr.* 1987;32(5):1085–1098.
2. Kelly C.A., Fee E., Ramlal P.S., Rudd J.W.M., Hesslein R.H., Anema C., and Schindler E.U. Natural variability of carbon dioxide and net epilimnetic production in the surface waters of boreal lakes of different sizes. *Limnol. Oceanogr.* 2001;46(5):1054–1064.
3. del Giorgio P.A., Williams P.J. Respiration in aquatic ecosystems: history and background. *Respiration in Aquatic Ecosystems*. Eds. P.A. del Giorgio and P.J. Williams. N.Y.: Oxford Univ. Press; 2023:1–17.
4. Маторин Д.Н., Горячев С.Н. *Флуоресценция хлорофилла микроводорослей в биотестировании загрязнений*. М.: Альтекс; 2017. 142 с.
5. Погосян С.И., Конюхов И.В., Рубин А.Б. *Проблемы экологической биофизики*. М. – Ижевск: АНО Ижевский институт компьютерных исследований; 2017. 270 с.

6. Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. *Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration*, vol. 19. Eds. G.C. Papageorgiou and Govindjee. Berlin.: Springer; 2004:279–319.
7. Papageorgiou G.C., Tsimilli-Michael M., Stamatidis K. The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. *Photosynth. Res.* 2007;94(2–3):275–290.
8. Stirbet A., Govindjee Chlorophyll *a* fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise. *Photosynth. Res.* 2012; 113(1–3):15–61.
9. Lazár D. The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* 2006; 33(1):9–30.
10. Schansker G., Tóth S.Z., Kovács L., Holzwarth A.R., Garab G. Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyll *a* fluorescence rise. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1807(9):1032–1043.
11. Vredenberg W.J., Bulychiev A. Photoelectric effects on chlorophyll fluorescence of photosystem II *in vivo*. Kinetics in the absence and presence of valinomycin. *Bioelectrochemistry.* 2003;60(1–2):87–95.
12. Sipka G., Magyar M., Mezzetti A., Akhtar P., Zhu Q., Xiao Y., Han G., Santabarbara S., Shen J.-R., Lambrev P.H., Garab G. Light-adapted charge-separated state of photosystem II: Structural and functional dynamics of the closed reaction center. *Plant Cell.* 2021;33(4):1286–1302.
13. Murchie E.H., Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp Bot.* 2013;64(13):3983–98.
14. Kuznetsov A.G., Konyukhov I.V., Pogosyan S.I., Rubin A.B. Microfluorimeter for studying the state of photosynthetic apparatus of individual cells of microalgae. *Oceanology.* 2021;61(6):1055–1063.
15. Volgusheva A.A., Todorenko D.A., Konyukhov I.V., Voronova E.N., Pogosyan S.I., Plyusnina T.Y., Khrushchev S.S., Antal T.K. Acclimation response of green microalgae *Chlorella sorokiniana* to 2,3',4,4',6-pentachlorobiphenyl. *Photochem. Photobiol.* 2022; 99(4):1106–1114.
16. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. *Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration*, vol. 19. Eds. G.C. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht.: Springer; 2004:321–362.
17. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J., Herdman M., Stanier R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1979; 111(1):1–61.
18. Harris E.H. *The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use*. San Diego: Academic Press; 1989. 780 pp.
19. Antal T.K., Osipov V., Matorin D.N., Rubin A.B. Membrane potential is involved in regulation of photosynthetic reactions in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2011;102(2):169–173.
20. Vanharanta M., Elovaara S., Franklin D.J., Spilling K., Tamelander T. Viability of pico- and nanophytoplankton in the Baltic Sea during spring. *Aquat. Ecol.* 2020;54:119–135.
21. Swoczyna T., Kalaji H.M., Bussotti F., Mojski J., Pollastrini M. Environmental stress – what can we learn from chlorophyll *a* fluorescence analysis in woody plants? A review. *Front. Plant Sci.* 2022;13:1048582.
22. Kalaji H.M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I., Cetner M.D., I. Lukasik, Goltsev V. and Ladle R.J. Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant.* 2016; 38(4):102.
23. Sasi S., Venkatesh J., Daneshi R.F., Gururani M.A. Photosystem II extrinsic proteins and their putative role in abiotic stress tolerance in higher plants. *Plants.* 2018;7(4):100.
24. Behrenfeld M.J., Milligan A.J. Photophysiological expressions of iron stress in phytoplankton. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2013;5:217–246.
25. Van de Waal D.B., Litchman E. Multiple global change stressor effects on phytoplankton nutrient acquisition in a future ocean. *Philos. Trans R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2020;375(1798):20190706.
26. Antal T.K., Krendeleva T.E., Tyystjärvi E. Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production. *Photosynth. Res.* 2015;125(3):357–381.
27. Петрова Е.В., Кукарских Г.П., Кренделева Т., Антал, Т.К. О механизмах и роли фотосинтетического образования водорода у зеленых микроводорослей. *Микробиол.* 2020;89(3):259–275.

Поступила в редакцию 08.05.2023

После доработки 12.09.2023

Принята в печать 20.09.2023

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the primary reactions of photosynthesis in microalgae single cell by microfluorimetric method

A.A. Volgusheva¹ , I.V. Konyukhov¹ , T.K. Antal^{2, *} 

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Laboratory of Integrated Environmental Research, Pskov State University, 21 Sovetskaya st., Pskov, 180000, Russia

*e-mail: taras_an@mail.ru

High-resolution chlorophyll fluorescence light induction curves (OJIP transients) are widely used to assess the primary photosynthetic responses of phototrophic microorganisms. Chlorophyll fluorescence measuring methods coupled with microscopy techniques provide

a promising opportunity to measure OJIP transients on individual algal cells, allowing scientists to investigate stress adaptation mechanisms related to reorganization of microalgae population or phytoplankton community. In this work, we first characterized the OJIP transients measured on individual algae cells using the original microfluorimeter and compared them with OJIP transients recorded in microalgae suspensions. Based on the results of the study, we proposed a method for analyzing OJIP curves of individual microalgae cells as well as ways to further improve microfluorimeters.

Keywords: *photosynthesis, OJIP transient, JIP-test, chlorophyll fluorescence, microfluorimetry, microalgae*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-24-00353.

Сведения об авторах

Волгушева Алена Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: volg-alena@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0414-1236>

Конюхов Иван Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: vanka.kon@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7686-461X>

Антал Тарас Корнелиевич — докт. биол. наук, проректор по научной работе ПсковГУ. Тел.: 8-811-220-16-99; e-mail: taras_an@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9690-8034>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 579.65

Бактерии рода *Bacillus* на Международной космической станции

Р.Р. Еникеев* , Л.М. Захарчук

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

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

С поверхностей оборудования российского сегмента Международной космической станции получены чистые культуры 19 штаммов спорообразующих бактерий. Изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств этих бактерий позволило отнести все штаммы к роду *Bacillus*. В результате использования методов MALDI-TOF и полногеномного секвенирования установлено, что из 19 штаммов бацилл шесть принадлежат к виду *B. paralicheniformis*, четыре — к *B. pumilus*, четыре — к *B. subtilis*, два — к *B. cereus* и один — к *B. amyloliquefaciens*. В соответствии с требованиями и нормами EUCAST 2023 изучена устойчивость полученных из российского сегмента Международной космической станции штаммов бацилл к таким антибиотикам, как имипенем, меропенем, цiproфлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, ванкомицин, эритромицин, клиндамицин и линезолид. У 11 штаммов бацилл обнаружена резистентность к эритромицину, у пяти штаммов — к клиндамицину. Лишь по одному штамму проявили резистентность к имипенему, левофлоксацину и норфлоксацину соответственно. Анализ полного генома штаммов бактерий, у которых была обнаружена устойчивость к эритромицину и/или клиндамицину, позволил установить, что резистентность к этим антибиотикам у *B. paralicheniformis* штаммов SE71, SE131, SE181, SE182 и SE183 обеспечивает ген резистентности к антибиотикам *ermD*. У *B. cereus* SE43 устойчивость к эритромицину кодирует ген *mphL*.

Ключевые слова: Российский сегмент Международной космической станции, бактерии рода *Bacillus*, устойчивость к антибиотикам, гены устойчивости, *Bacillus cereus*, *Bacillus paralicheniformis*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-5

Введение

Исследования состояния здоровья космонавтов на Международной космической станции (МКС) показывают, что работа в космосе приводит к потере мышечной массы, ухудшению зрения, снижению иммунитета, стрессам и нарушениям в микробиоме [1]. Важно, что в космосе люди зависят от наземной службы поддержки — в частности, не могут пользоваться клиническим сопровождением, поэтому особенно уязвимы к заболеваниям. МКС представляет собой замкнутое пространство с постоянной температурой, повышенной влажностью, наличием доступных субстратов и является благоприятной средой для развития микроорганизмов. Микробиом МКС напоминает некоторые микробиомы «закрытых помещений» на Земле — домов, офисов, больниц и содержит множество бактерий, грибов и вирусов [2]. Исследования микробиома МКС показали, что там встречаются в основном представители родов *Bacillus*, *Micrococcus* и *Staphylococcus* [3]. Сле-

довательно, на борту МКС особенно важную роль играют спорообразующие представители *Bacillus*, способные выживать в неблагоприятных условиях среды. При этом известно, что некоторые виды бацилл способны вызывать заболевания [4].

Целями настоящей работы стало выделение с рабочих поверхностей российского сегмента Международной космической станции (РС МКС) изолятов спорообразующих штаммов бактерий рода *Bacillus*, их идентификация, изучение физиолого-биохимических свойств, а также определение устойчивости к ряду клинически значимых антибиотиков и выявление возможных механизмов этой резистентности.

Материалы и методы

Отбор проб с поверхностей приборов РС МКС, их доставку на Землю, а также получение первичных изолятов бактерий и чистых культур спорообразующих бактерий осуществляли, как описано ранее [5]. При исследовании морфологи-

ческих, культуральных и физиолого-биохимических признаков бактерий, а также дифференциация бактерий рода *Bacillus* от представителей сходных родов бактерий, образующих эндоспоры, основывались на соответствующих руководствах [6]. Первичную идентификацию чистых культур бактерий, по сумме признаков предположительно относящихся к роду *Bacillus*, осуществляли методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) на приборе MALDI-TOF autoflex III L200 (Biotyper Bruker, Германия) [7]. Для оценки чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом использовали агар Мюллера-Хинтон состава (г/л): мясной экстракт сухой — 3,0; гидролизат казеина сухой — 17,5; крахмал растворимый — 0,5; агар — 18,0; вода дистиллированная — до 1 л, pH = 7,0 [8]. Суспензию бактерий 0,5 единиц по стандарту мутности Мак-Фарланда наносили на поверхность питательной среды в чашках Петри в количестве 200 мкл и распределяли с помощью стеклянного шпателя. Диски с антибиотиками (Научно-исследовательский центр фармакотерапии, Россия) наносили на поверхность засеянной среды, через 15 мин после инокуляции среды в чашках суспензией бактерий. Через 15 мин чашки с дисками помещали в термостат и инкубировали при 35°C в течение 20 ч [8]. Определяли специфические значения диаметров зон подавления роста бактерий антибиотиками, используемыми для оценки штаммов, в соответствии с клиническими категориями «чувствительный», «резистентный» или «зона технической неопределенности» по таблицам критериев интерпретации результатов, представленным European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [8]. Выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных на жидкой среде с мясопептонным бульоном и 1% глюкозы, проводили с помощью набора реактивов FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals, США) по протоколу производителя. Геномную ДНК секвенировали с использованием платформ Illumina MiSeq (Illumina Inc., США). Библиотеки Illumina были подготовлены с использованием набора библиотек Kapa Hyperplus (Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные последовательности были идентифицированы с использованием программы сверхбыстрой классификации метагеномных последовательностей Kraken [9]. Установление наличия в геноме штаммов бактерий рода *Bacillus* генов устойчивости к антибиотикам осуществляли с помощью базы данных The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [10]. Результаты в их конечном виде получали путем вычисления среднего арифметического ($\bar{X}$) из результатов всех повторностей (X_n) при условии, что они различались не более чем на

10% ($|X_n - \bar{X}| \leq 0,05 \bar{X}$). При этом расчет среднего арифметического проводили, исключая «сомнительные результаты» («X»), не входящие в доверительный интервал $|X_n - \bar{X}| = t \cdot \sigma$, где $\bar{X}$ — среднее арифметическое без учета «сомнительных результатов», t — нормированное отклонение при $P_{0,95}$ для малых выборок ($n < 30$), а σ — среднее квадратичное отклонение без учета «X»:

$$\pm \sqrt{\frac{\sum (X_n - \bar{X})^2}{n-1}}.$$

Результаты и обсуждение

Получение и первичная характеристика штаммов бактерий. Получение первичных изолятов бактерий осуществляли высевом образцов материалов, отобранных на РС МКС, на поверхность плотных питательных сред — таких как мясопептонный агар с 1% глюкозы и бульон сусло-агар. Из первичных изолятов были получены чистые культуры спорообразующих бактерий. Затем исследовали морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки соответствующих штаммов. Определяли такие свойства выделенных бактерий, как форма и диаметр клеток, образование эндоспор, окраска по Граму, отношение к кислороду, способность синтезировать каталазу и оксидазу, образование кислоты при сбраживании глюкозы, гидролиз крахмала, восстановление нитратов и некоторые другие физиологические и биохимические признаки (табл. 1). По сумме фенотипических признаков осуществлена дифференциация исследуемых штаммов от бактерий сходных родов, образующих эндоспоры, что позволило предположительно отнести 19 штаммов спорообразующих бактерий к роду *Bacillus* (табл. 1).

Идентификация штаммов с помощью MALDI-TOF. Дальнейшую идентификацию штаммов бактерий, по сумме признаков предположительно отнесенных к роду *Bacillus*, осуществляли методом MALDI-TOF [7]. Все 19 штаммов бактерий с использованием масс-спектрометрии были отнесены к роду *Bacillus* и идентифицированы до вида как *B. subtilis* (четыре штамма), *B. pumilus* (четыре штамма), *B. licheniformis* (три штамма), *B. cereus* (два штамма). При этом шесть штаммов бактерий рода *Bacillus* из 19 — SE21, SE41, SE71, SE132, SE161, SE183 — методом MALDI-TOF до вида идентифицировать не удалось (табл. 2).

Определение чувствительности к антибиотикам. У идентифицированных с помощью метода MALDI-TOF бактерий изучали устойчивость к действию ряда антибиотиков диско-диффузионным методом [8]. В последнем выпуске EUCAST 2023 [8] присутствуют критерии интерпретации для оценки устойчивости бактерий *Bacillus* spp. с помощью диско-диффузионного метода для таких антибиотиков, как имипенем, меропенем, ци-

профлосаксин, левофлосаксин, норфлосаксин, ванкомицин, эритромицин, клиндамицин и линезолид, поэтому именно эти антибиотики были использованы в нашей работе. По размерам зон подавления роста штамма бактерии соответствующим антибиотиком этот штамм, в соответствии с таблицами, представленными в EUCAST 2023, можно было отнести к категориям чувстви-

тельный (S), резистентный (R) или к категории ATU – зоне технической неопределенности. Изучение устойчивости к перечисленным антибиотикам 19 штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из РС МКС, показало, что почти все 19 штаммов бацилл, выделенных из РС МКС, проявляют чувствительность к первым двум исследуемым антибиотикам – имипенему и меропенему (табл. 2).

Таблица 1

Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из проб, доставленных из РС МКС

Параметр	Штамм бактерий																		
	SE 12	SE 21	SE 41	SE 42	SE 43	SE 4	SE 62	SE 71	SE 131	SE 132	SE 15	SE 161	SE 171	SE 17	SE 181	SE 182	SE 183	SE 191	SE 192
Диаметр клетки > 1 мкм	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Форма спор, округлые	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Параспоральные кристаллы	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP-тест	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рост при 50°C	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Анаэробный рост	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	–	–
Образование кислоты при росте на глюкозе	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование газа при росте на глюкозе	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Гидролиз крахмала	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–
Восстановление нитратов	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–
Использование цитрата	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Разложение тирозина	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Таблица 2

Диаметры зон подавления роста штаммов бактерий рода *Bacillus* (в миллиметрах), выделенных из РС МКС, на среде Мюллера-Хинтона под действием дисков с разными антибиотиками

Идентификация штаммов на основании MALDI-TOF	Антибиотик									Идентификация штаммов на основании полногеномного секвенирования
	Имипенем	Меропенем	Ципрофлоксацин	Левифлоксацин	Норфлоксацин	Ванкомицин	Эритромицин	Клиндамицин	Линезолид	
<i>B. subtilis</i> SE12	40 (S)	40 (S)	35 ATU	35 ATU	28 (S)	25 (S)	30 (S)	30 (S)	40 (S)	
<i>Bacillus</i> sp. SE21	40 (S)	40 (S)	35 ATU	36 ATU	25 (S)	20 (S)	22 (R)	30 (S)	26 (S)	
<i>Bacillus</i> sp. SE41	32 (S)	32 (S)	30 ATU	30 ATU	25 (S)	18 (S)	21 (R)	30 (S)	40 (S)	<i>B. amyloliquefaciens</i> SE41
<i>B. cereus</i> SE42	32 (S)	38 (S)	25 ATU	22 (R)	30 (S)	20 (S)	28 (S)	25 (S)	34 (S)	<i>B. cereus</i> SE42
<i>B. cereus</i> SE43	34 (S)	37 (S)	26 ATU	25 ATU	20 (R)	16 (S)	17 (R)	30 (S)	30 (S)	<i>B. cereus</i> SE 43
<i>B. pumilus</i> SE4	35 (S)	35 (S)	35 ATU	35 ATU	32 (S)	30 (S)	35 (S)	35 (S)	45 (S)	
<i>B. subtilis</i> SE62	40 (S)	40 (S)	35 ATU	38 ATU	30 (S)	19 (S)	20 (S)	30 (S)	29 (S)	
<i>Bacillus</i> sp. SE71	32 (S)	30 (S)	32 ATU	30 ATU	30 (S)	20 (S)	16 (R)	11 (R)	35 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE71
<i>B. licheniformis</i> SE131	35 (S)	35 (S)	30 ATU	26 ATU	26 (S)	21 (S)	3 (R)	12 (R)	34 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE131
<i>Bacillus</i> sp. SE132	42 (S)	40 (S)	32 ATU	32 ATU	26 (S)	20 (S)	25 (S)	25 (S)	30 (S)	
<i>B. subtilis</i> SE15	35 (S)	35 (S)	35 ATU	30 ATU	30 (S)	26 (S)	2 (R)	25 (S)	35 (S)	
<i>Bacillus</i> sp. SE161	40 (S)	37 (S)	25 ATU	29 ATU	30 (S)	24 (S)	4 (R)	13 (R)	40 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE161
<i>B. pumilus</i> SE171	38 (S)	40 (S)	35 ATU	37 ATU	26 (S)	21 (S)	15 (R)	30 (S)	30 (S)	
<i>B. subtilis</i> SE17	40 (S)	40 (S)	28 ATU	27 ATU	27 (S)	24 (S)	28 (S)	20 (S)	31 (S)	
<i>B. licheniformis</i> SE181	36 (S)	40 (S)	35 ATU	35 ATU	30 (S)	23 (S)	17 (R)	14 (R)	35 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE181
<i>B. licheniformis</i> SE182	30 (S)	30 (S)	34 ATU	29 ATU	24 (S)	20 (S)	20 (R)	21 (S)	30 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE182
<i>Bacillus</i> sp. SE183	40 (S)	40 (S)	31 ATU	32 ATU	31 (S)	22 (S)	20 (R)	15 (R)	28 (S)	<i>B. paralicheniformis</i> SE183
<i>B. pumilus</i> SE191	31 (S)	31 (S)	31 ATU	35 ATU	25 (S)	19 (S)	28 (S)	20 (S)	28 (S)	
<i>B. pumilus</i> SE192	29 (R)	25 (S)	33 ATU	33 ATU	25 (S)	20 (S)	30 (S)	25 (S)	26 (S)	

Примечание: знак S означает чувствительный штамм; R – резистентный; ATU – зона технической неопределенности.

Только у *B. pumilus* SE192 обнаружена устойчивость к имипенему. Опыты с еще двумя антибиотиками — ципрофлоксацином и левофлоксацином — показали принадлежность штаммов в основном к категории АТУ (табл. 2), когда по зонам подавления роста бактерий на основании имеющихся в литературе данных трудно или невозможно определить клиническую эффективность и возможность практического применения препаратов для лечения больных без получения дополнительных данных [8]. И только один штамм — *Bacillus* sp. SE42 показал устойчивость к левофлоксацину (табл. 2). К следующим антибиотикам — норфлоксацину и ванкомицину — почти все штаммы также проявили чувствительность, кроме штамма *B. cereus* SE43, проявившего устойчивость к норфлоксацину (табл. 2). Особенно интересные результаты получились при использовании для подавления роста бактерий дисков с эритромицином. У 11 штаммов из 19 обнаружена резистентность к этому антибиотику (табл. 2). Следующим антибиотиком был клиндамицин, к которому пять штаммов бацилл показали устойчивость. А к последнему из исследуемых антибиотиков — линезолиду — все 19 штаммов *Bacillus* проявили чувствительность (табл. 2). Следует отметить, что 5 из 19 штаммов бацилл — SE71, SE131, SE161, SE181 и SE183 проявили устойчивость к двум антибиотикам — эритромицину и клиндамицину (табл. 2).

Полногеномное секвенирование и определение наличия генов устойчивости. С целью уточнения систематического положения штаммов бацилл, проявивших устойчивость к антибиотикам (табл. 2), а также для определения наличия генов устойчивости к этим антибиотикам было проведено полногеномное секвенирование прежде всего условных патогенов *B. cereus* SE42 и *B. cereus* SE43, а также штаммов, проявивших устойчивость к эритромицину и клиндамицину (табл. 2). Результаты полногеномного секвенирования подтвердили принадлежность штаммов SE42 и SE43 к виду *B. cereus*. Установлено также, что штаммы бацилл, идентифицированные по методу MALDI-TOF как *B. licheniformis* SE131, SE181, SE182, следует отнести к *B. paralicheniformis* SE131, SE181, SE182. Кроме того, штаммы *Bacillus* sp. SE71, SE161, SE183 по результатам полногеномного секвенирования также идентифицированы как *B. paralicheniformis* SE71, SE161, SE183 (табл. 2). Таким образом, в результате использования методов MALDI-TOF и полногеномного секвенирования удалось показать, что из 19 штаммов бацилл шесть принадлежат к виду *B. paralicheniformis*, по четыре — к *B. pumilus* и *B. subtilis*, два — к *B. cereus* и один — к *B. amyloliquefaciens* (табл. 2). С помощью данных полногеномного секвенирования штаммов, проявивших устойчивость к рекомендуемым для бацилл антибиотикам (табл. 2), с ис-

пользованием базы данных CARD [10] установлено наличие в геномах большинства штаммов бацилл, резистентных к эритромицину и клиндамицину, гена *ermD* (эритромицин-резистентная метилаза), ответственного за устойчивость к макролиду эритромицину и линкозамиду клиндамицину (табл. 3). Механизмом устойчивости к этим антибиотикам является посттранскрипционная модификация рибосомальной РНК 23S путем моно/диметилирования остатка аденина. В результате нарушается комплементарность антибиотика к рибосоме и препарат не может ингибировать синтез белка. Все метилазы рРНК метилируют один и тот же остаток аденина, что приводит к фенотипу устойчивости к макролидам-линкозамидам-стрептограмину В, при этом было показано, что гены *erm* обеспечивают перекрестную резистентность к эритромицину и клиндамицину у *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* и преобладают у бактерий с высокой мультirezистентностью [11, 12]. Полногеномное секвенирование и фенотипическое тестирование 104 штаммов *B. licheniformis* и *B. paralicheniformis* из различных источников показало, что у всех 30 штаммов *B. paralicheniformis* и у 20 из 74 штаммов *B. licheniformis* обнаружен хромосомный ген *ermD*, кодирующий рРНК-аденин-N6-диметилазу, состоящую из 286–287 аминокислот [13]. Следовательно, устойчивость к эритромицину у бацилл очень хорошо коррелирует с наличием гена *ermD*. Ген *ermD* обнаружен нами у штаммов *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 (табл. 3). Показано, что классы генов *ermD* и *ermC* локализованы на хромосоме у *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* и близкородственных видов *Bacillus*, резистентных к эритромицину и клиндамицину, при этом они не связаны с какими-либо мобильными генетическими элементами [11, 13]. Кроме генов *ermD* у бактерий *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 обнаружены гены устойчивости к бацитрацину *bcrA*, *bcrB* и *bcrC* (табл. 3). Эти гены кодируют АТФ-связывающие кассетные транспортеры (ATP-binding cassette), обычно участвующие в транслокации родственных им субстратов, которая управляется гидролизом АТФ. Переносчик BcrABC обеспечивает иммунитет к синтезирующему бацитрацин штамму *B. licheniformis* [14]. В этой системе белки BcrB и BcrC образуют трансмембранный канал, в то время как два белка BcrA функционируют как АТФазы, обеспечивающие транспорт энергии. Механизм устойчивости к бацитрацину, обеспечиваемый переносчиками Bcr, универсален — он одинаково функционален как у *B. subtilis*, так и у граммотрицательной кишечной палочки [14].

У резистентного к эритромицину штамма *B. cereus* SE43, не имеющего генов *erm*, обнаружен ген *mphL* (табл. 3). Ген *mphL* является гомологом

кодируемых хромосомами макролидных фосфотрансфераз (Mphs), которые инактивируют 14- и 15-членные макролиды эритромицин, кларитромицин, азитромицин у *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* [15]. Ферменты Mphs инактивируют макролид путем его модификации фосфорилированием 2'-ОН незаменимого диметиламиносахара, что предотвращает связывание антибиотика с рибосомой. Существует два функциональных кластера Mphs в группе бактерий *B. cereus*. Mphs кластера А инактивируют только 14–15-членные макролиды, в то время как Mphs кластера В инактивируют 14-, 15- и 16-членные соединения. Область генома, окружающая ген *mph* кластера В, связана с различ-

ными плазмидными последовательностями, что позволяет предположить, что этот ген является геном приобретенной резистентности. Напротив, ген *mph* кластера А расположен в хромосомной области, консервативной среди всех изолятов группы *B. cereus*, и имеющиеся данные указывают на то, что он был приобретен на ранней стадии эволюции группы. Следовательно, ген *mphL*, инактивирующий только 14- и 15-членные макролиды и относящийся к кластеру А, можно считать геном внутренней резистентности, не связанным с плазмидными последовательностями. У резистентного к эритромицину *B. cereus* SE43 обнаружен также ген *bcl-1* (табл. 3), кодирующий хромосомную β -лактамазу

Таблица 3

Гены устойчивости к антибиотикам, обнаруженные у штаммов бактерий рода *Bacillus* с использованием базы данных CARD

Идентификация штаммов на основании полногеномного секвенирования	Ген	Кодирует действие на классы антибиотиков	Механизм действия	Ссылка
<i>B. cereus</i> SE42	<i>clbA</i>	линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, оксазолидинон, феникол, плевромутилин	изменение мишени антибиотика	[20]
	<i>bcl-1</i>	цефалоспорины, пенициллины	инактивация антибиотика	[16]
<i>B. cereus</i> SE43	<i>satA</i>	нуклеозидные антибиотики	инактивация антибиотика	[17]
	<i>bcl-1</i>	цефалоспорины, пенициллины	инактивация антибиотика	[16]
	<i>bla2</i>	карбапенем, цефалоспорин, пенам	инактивация антибиотика	[18]
	<i>mphL</i>	макролиды	инактивация антибиотика	[15]
	<i>fosB</i>	фосфомицин	инактивация антибиотика	[19]
<i>B. paralicheniformis</i> SE71	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	
<i>B. paralicheniformis</i> SE131	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	
<i>B. paralicheniformis</i> SE181	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	
<i>B. paralicheniformis</i> SE182	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	
<i>B. paralicheniformis</i> SE183	<i>ermD</i>	макролиды, линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, стрептограмин В	изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>bcrA</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	[14]
	<i>bcrB</i>	пептидные антибиотики	эффлюкс	
	<i>bcrC</i>	пептидные антибиотики	изменение мишени антибиотика	

у *B. clausii* и активную в отношении цефалоспоринов [16], ген *satA*, кодирующий ацетилирование стрептогтрицина и блокирующий токсический эффект данного антибиотика у *B. subtilis* и *B. anthracis* [17], ген *bla2*, кодирующий металло- β -лактамазу у *B. anthracis* и обеспечивающий резистентность к цефалоспорином и карбопенему [18], ген *fosB*, кодирующий у *B. subtilis* синтез белка, обеспечивающего устойчивость к ингибитору синтеза клеточной стенки фосфомицину [19].

У чувствительного к эритромицину и клиндамицину *B. cereus* SE42 (табл. 2), обнаружен ген *bcl-1* (табл. 3), кодирующий хромосомную β -лактамазу, активную в отношении цефалоспоринов [16], а также ген *clbA*, кодируемый плазмидой и принадлежащий к кластеру генов *clb* семейства генов *cfr*, кодирующих синтез колибактина, катализирующего метилирование субъединицы 23S рРНК в С8-положении A2503. Метилирование 23S рРНК придает устойчивость к некоторым классам антибиотиков, включая линкозамид клиндамицин [20]. Однако *B. cereus* SE42, как уже говорилось, не проявил резистентности к клиндамицину (табл. 2).

Таким образом, устойчивость к эритромицину у *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 и клиндамицину у *B. paralicheniformis* SE71, SE131, SE181, SE183 обеспечивает ген *ermD*. У *B. cereus* SE43 устойчивость к эритромицину кодирует ген *mphL* (табл. 3).

Вид *B. paralicheniformis* (табл. 2) был выделен в отдельный вид недавно, поэтому сведений о его патогенности еще очень мало [21]. Что касается наиболее близкого к *B. paralicheniformis* по результатам филогенетического анализа гена 16S рРНК вида *B. licheniformis*, то последний признан патогеном человека, вызывающим инфекции главным образом у пациентов с ослабленным иммунитетом, постоянным катетером или находящимися на автоматическом перитонеальном диализе [22, 23].

B. cereus, два штамма которого обнаружены нами на РС МКС (табл. 2), является наиболее опасным для человека, за исключением *B. anthracis*, видом бацилл. Он занимает третье место после видов *Salmonella* spp. и *Staphylococcus aureus* среди инфекций, связанных с пищевыми отравлениями, и этот условно-патогенный микроорганизм способствует возникновению рвотных и диарейных синдромов у животных и людей. *B. cereus* продуцирует широкий спектр потенциальных факторов вирулентности, включая токсины и ферменты, разрушающие ткани [24]. При этом *B. cereus* формирует особую группу, включающую *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* и *B. anthracis* [25]. Некорректная антибиотикотерапия вызывает высокий уровень смертности у пациентов с бактериемией, вызван-

ной *B. cereus*, поэтому препараты для терапии должны применяться с учетом чувствительностью к ним возбудителя [4]. Однако еще мало данных о клинических характеристиках штаммов *B. cereus*, вызывающих инфекции системы кровообращения и их эмпирической терапии. Эти инфекции чаще всего связаны с такими факторами передачи, как аппараты искусственной вентиляции легких и внутрисосудистые катетеры [26]. Обнаружение на МКС условно-патогенных бактерий, обладающих резистентностью в отношении некоторых клинических антибиотиков, требует постоянного скрининга микробиоты станции для предупреждения влияния этих микроорганизмов на здоровье космонавтов.

Представители группы *B. cereus* не являются редкостью на МКС [27]. Мы обнаружили на МКС два штамма *B. cereus* и пять штаммов *B. paralicheniformis*, резистентных к эритромицину и/или клиндамицину (табл. 2). В связи с этим возник вопрос о возможности распространения на МКС устойчивости к этим антибиотикам от резистентных к ним бактерий к другим видам. Из-за тесного родства между *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* есть предположение, что *B. anthracis* является подвидом *B. cereus* и перечисленные виды бацилл подвергаются горизонтальному переносу генов и обмену плазмидами [28]. Ген *mphL*, обеспечивающий резистентность к эритромицину у *B. cereus* SE43 (табл. 3), находится в хромосомной области, консервативной у всех изолятов группы *B. cereus*, он был приобретен на ранней стадии эволюции группы *B. cereus* и является у этих бактерий геном внутренней резистентности, не связанным с плазмидными последовательностями [15]. Что касается гена *ermD*, кодирующего резистентность к эритромицину и клиндамицину у *B. paralicheniformis*, то он присутствует на хромосоме в эволюционных кладах *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*, а также близкородственных видов *Bacillus* и, как и ген *mphL*, не связан с какими-либо мобильными генетическими элементами [13]. Следовательно, гены *ermD* и *mphL*, кодирующие устойчивость обитающих на МКС *B. paralicheniformis* и *B. cereus* к эритромицину и клиндамицину, являются хромосомными генами, поэтому, видимо, не представляют потенциальной опасности в результате их горизонтального переноса к штаммам бактерий рода *Bacillus*, обитающих на МКС [13, 15].

Исследование осуществлялось в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ №23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7) без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Checinska A., Probst A.J., Vaishampayan P., White J.R., Kumar D., Stepanov V.G., Fox G.E., Nilsson H.R., Pierson D.L., Perry J., Venkateswaran K. Microbiomes of the dust particles collected from the International Space Station and spacecraft assembly facilities. *Microbiome*. 2015;3(1):50–68.
2. Gauzere C., Godon J.J., Blanquart H., Ferreira S., Moularat S., Robine E., Moletta-Denat M. Core species in three sources of indoor air belonging to the human micro-environment to the exclusion of outdoor air. *Sci. Total Environ*. 2014;485–486:508–517.
3. Mora M., Wink L., Kogler I., Mahnert A., Rettberg P., Schwendner P., Demets R., Cockell C., Alekhova T., Klingl A., Krause R., Zolotarief A., Alexandrova A., Moissl-Eichinger C. Space Station conditions are selective but do not alter microbial characteristics relevant to human health. *Nat. Commun*. 2019;10(1):3990.
4. Bianco A., Capozzi L., Monno M.R., Del Sambio L., Manzulli V., Pesole G., Loconsole D., Parisi A. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from human bacteremia by whole-genome sequencing. *Front. Microbiol*. 2021;11:599524.
5. Alekhova T.A., Zakharchuk L.M., Tatarinova N.Y., Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Skryabin K.G. Diversity of bacteria of the genus *Bacillus* on board of International Space Station. *Dokl. Biochem. Biophys*. 2015;465(1):104–107.
6. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. The Firmicutes*. Eds. P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, and W.B. Whitman. N.Y.: Springer; 2009. 1450 pp.
7. Hrabak J., Chudackova E., Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization time- of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013;26(1):103–114.
8. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 13.0. 2023. <http://www.eucast.org>.
9. Wood D.E., Salzberg S.L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol*. 2014;15(3):R46.
10. Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D690–D699.
11. Jeong D.W., Lee B., Heo S., Oh Y., Heo G., Le J.H. Two genes involved in clindamycin resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* identified by comparative genomic analysis. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231274.
12. Anjum R., Krakat N. Detection of multiple resistances, biofilm formation and conjugative transfer of *Bacillus cereus* from contaminated soils. *Curr. Microbiol*. 2016;72:321–328.
13. Agersø Y., Bjerre K., Brockmann E., Johansen E., Nielsen B., Siezen R., Stuer-Lauridsen B., Wels M., Zeidan A.A. Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210363.
14. Podlessek Z., Comino A., Herzog-Velikonja B., Grabnar M. The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol. Lett*. 2000;188(1):103–106.
15. Wang C., Sui Z., Leclercq S.O., Zhang G., Zhao M., Chen W., Feng J. Functional characterization and phylogenetic analysis of acquired and intrinsic macrolide phosphotransferases in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol*. 2015;17(5):1560–1573.
16. Girlich D., Leclercq R., Naas T., Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of the chromosome-encoded class A β -lactamase BCL-1 from *Bacillus clausii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007;51(11):4009–4014.
17. Burckhardt R.M., Escalante-Semerena J.C. In *Bacillus subtilis*, the SatA (formerly YyaR) acetyltransferase detoxifies streptothricin via lysine acetylation. *Appl. Environ. Microbiol*. 2017;83(21):e01590–17.
18. Bhattacharya S., Junghare V., Pandey N.K., Ghosh D. Patra H., Hazra S. An insight into the complete biophysical and biochemical characterization of novel class A beta-lactamase (Bla1) from *Bacillus anthracis*. *Intern. J. Biol. Macromolec*. 2020;145:510–526.
19. Cao M., Bernat B.A., Wang Z., Armstrong R.N., Helmann J.D. FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma (W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 2001;183(7):2380–2383.
20. Hansen L.H., Planellas M.H., Long K.S., Vester B. The order *Bacillales* hosts functional homologs of the worrisome *cfr* antibiotic resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012;56(7):3563–3567.
21. Dunlap C.A., Kwon S., Rooney A.P., Kim S. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2015;65(10):3487–3492.
22. Albaker W. Successful Treatment of *Bacillus licheniformis* peritonitis in peritoneal dialysis patient with intraperitoneal vancomycin: a case report. *Int. Med. Case Rep. J*. 2021;14:215–218.
23. Zhong C., Wang F., Zhou H., Liu J., Hu J., Chen Y. Bacteremia caused by accidental injection of *Bacillus licheniformis* microbiota modulator through the central venous catheter: a case report. *Medicine*. 2022;101(4):e28719.
24. Zhang Q., Zuo Z., Guo Y., Zhang T., Han Z., Huang S., Karama M., Saleemi M. K., Khan A., He C. Contaminated feed-borne *Bacillus cereus* aggravates respiratory distress post avian influenza virus H9N2 infection by inducing pneumonia. *Sci. Rep*. 2019;9(1):7231.
25. Schmid P.J., Maitz S., Kittinger C. *Bacillus cereus* in packaging material: molecular and phenotypical diversity revealed. *Front. Microbiol*. 2021;12:698974.
26. Hino C., Ozaki M., Kitahara T., Kouda K., Shikichi K., Nakamura I., Kawai S., Oie S. Peripheral parenteral nutrition solutions and bed bath towels as risk factors for nosocomial peripheral venous catheter-related bloodstream infection by *Bacillus cereus*. *Int. J. Med. Sci*. 2023;20(5):566–571.

27. Novikova N., De Boever P., Poddubko S., Deshevaya E., Polikarpov N., Rakova N., Coninx I., Mergey M. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Microbiol. Res.* 2006;157(1):5–12.

28. Kaminska P.S., Yernazarova, A., Drewnowska J.M., Zambrowski G., Swiecicka I. The worldwide distribution of

genetically and phylogenetically diverse *Bacillus cereus* isolates harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids. *Environ. Microbiol. Rep.* 2015;7(5):738–745.

Поступила в редакцию 27.06.2023

После доработки 10.10.2023

Принята в печать 12.10.2023

RESEARCH ARTICLE

Bacteria of the genus *Bacillus* on the Russian segment of the International Space Station

R.R. Yenikeev* , L.M. Zakharchuk 

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

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

Pure cultures of 19 strains of spore-forming bacteria were obtained from the equipment surfaces of the Russian segment of the International Space Station. The study of morphological, cultural and physiological-biochemical properties of these bacteria allowed us to attribute all strains to the genus *Bacillus*. As a result of using MALDI-TOF methods and genome-wide sequencing, it was found that out of 19 bacillus strains, six belong to the species *B. paralicheniformis*, four to *B. pumilus*, four to *B. subtilis*, two to *B. cereus* and one to *B. amyloliquefaciens*. In accordance with the requirements and norms of EUCAST 2023, the resistance of bacillus strains obtained from the Russian segment of the International Space Station to antibiotics such as imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, vancomycin, erythromycin, clindamycin and linezolid was studied. Resistance to erythromycin was found in 11 strains of bacilli and five strains showed resistance to clindamycin. Only one strain showed resistance to imipenem, levofloxacin and norfloxacin, respectively. Analysis of the complete genome of bacterial strains in which resistance to erythromycin and (or) clindamycin was found made it possible to establish that resistance to these antibiotics in *B. paralicheniformis* strains SE71, SE131, SE181, SE182, SE183 provides the *ermD* antibiotic resistance gene. In *B. cereus* SE43, resistance to erythromycin encodes the *mphL* gene.

Keywords: Russian segment of the International Space Station, bacteria of the genus *Bacillus*, antibiotic resistance, resistance genes, *Bacillus cereus*, *Bacillus paralicheniformis*

Funding: The study was carried out within the framework of a scientific project to fulfill the state task of Moscow State University, project number 23-1-21 (registration number CITS 121032300094-7).

Сведения об авторах

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

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.355

Первичные процессы фотосинтеза *Thalassiosira weissflogii* при воздействии ципрофлоксацина

Д.А. Тодоренко^{1,*} , Н.Д. Сидоченко² , А.А. Байжуманов¹ ,
Л.Б. Братковская³ , Д.Н. Маторин¹

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

²Российский университет дружбы народов, Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

³Кафедра общей экологии и гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

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

Фторхинолоновые антибиотики, такие как ципрофлоксацин, активно использовались в медицинской практике, в том числе в пандемию COVID-19, для подавления побочных бактериальных инфекций. Широкое применение и неправильная утилизация приводят к появлению антибиотиков в окружающей среде, что может оказывать воздействие на природные водные организмы, включая фитопланктон. Воздействие фторхинолоновых антибиотиков на процессы фотосинтеза диатомовых микроводорослей, которые являются основными продуцентами в морских экосистемах, мало изучено. В работе исследовано воздействие антибиотика ципрофлоксацина на первичные процессы фотосинтеза морской диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii*. Показано, что ципрофлоксацин воздействует на работу фотосистемы II (ФСII), препятствуя передаче поглощенной энергии от возбужденных молекул хлорофилла антенны к реакционному центру (РЦ) ФСII (Φ_{D_0}). При воздействии ципрофлоксацина выявлено снижение эффективности донирования электрона к $P680^+$ (F_V/F_O), ингибирование квантового выхода ФСII (F_V/F_M), снижение доли активных РЦ (ABS/RC) и увеличение диссипации поглощенной энергии на РЦ (DI_o/RC). Показано, что механизм действия ципрофлоксацина связан с повреждением РЦ ФСII. Ципрофлоксацин усиливает светочувствительность микроводорослей и вызывает увеличение количества продуктов перекисного окисления липидов. Предлагается использование параметров флуоресценции хлорофилла для анализа воздействия антибиотиков на микроводоросли.

Ключевые слова: морские диатомовые микроводоросли, кривые ОЖР, фторхинолоновые антибиотики, фотосистема II, флуоресценция хлорофилла, фотоингибирование

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-6

Введение

Фармацевтические препараты, включая антибиотики, являются опасными микрозагрязнителями окружающей среды из-за медленной деградации, повышенной персистентности и биотоксичности [1, 2]. Широкое использование антибиотиков в здравоохранении, сельском хозяйстве, птицеводстве и аквакультуре, а также неправильная утилизация привели к повсеместному их распространению в окружающей среде. Антибиотики лишь частично удаляются в ходе очистки сточных вод на очистных сооружениях и впоследствии попадают в поверхностные воды [3]. Антибиотики обычно обнаруживаются в концентрациях от нг/л до мкг/л в поверхностных, подземных и морских

водах [4–6], а в некоторых случаях даже на уровне мг/л [7]. В водной среде антибиотики могут быть токсичны для разных организмов, вызывая неблагоприятные последствия для водных экосистем в целом [8].

Фотосинтезирующие организмы являются основой пищевой цепи в водных экосистемах, и любые изменения в их жизнеспособности могут привести к серьезным последствиям на более высоких трофических уровнях. Несмотря на то, что целевым организмом, на который направлено действие антибиотиков, являются бактерии, антибиотики могут оказывать неблагоприятное воздействие и на эукариотические микроводоросли — в частности, на такие органеллы, как ми-

тохондрии и хлоропласты, имеющие собственный геном [9].

Одним из наиболее активно используемых антибиотиков широкого спектра действия в медицине и ветеринарии является ципрофлоксацин (ЦФ), относящийся к группе фторхинолонов. Фторхинолоновые антибиотики широко использовались в пандемию COVID-19 для подавления побочных бактериальных инфекций [10]. ЦФ эффективен в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий за счет нарушения синтеза бактериальной ДНК путем ингибирования лигазной активности ферментов: топоизомеразы II (ДНК-гиразы) и ДНК-топоизомеразы IV. ЦФ является распространенным загрязнителем окружающей среды [1]. Известно, что фторхинолоновые антибиотики устойчивы к биodeградации, поэтому остатки фторхинолонов и их производных обнаруживаются в природных водоемах. Мировая медиана концентрации ЦФ в пресноводных экосистемах составляет 0,164 мг/л, а его максимальная обнаруженная концентрация — 6,5 мг/л [11]. Фторхинолоны могут оказывать токсическое воздействие на микроводоросли, что может приводить к нарушению их жизненных процессов [12–14]. Имеющиеся данные о токсичности ЦФ для микроводорослей в основном выполнены на зеленых пресноводных микроводорослях, тогда как мало данных о воздействии ЦФ на морские диатомовые микроводоросли, которые являются основой фотосинтетической продукции морских экосистем. В настоящей работе исследовано воздействие ЦФ в разных концентрациях на первичные процессы фотосинтеза, связанные с поглощением квантов света, преобразованием поглощенной энергии в реакционных центрах (РЦ) и фотосинтетическим электронным транспортом, у диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G.A. Fryxell & Hasle 1977 с помощью снятия световых и индукционных кривых флуоресценции хлорофилла.

Материалы и методы

Объектом исследования служила чистая культура морской одноклеточной диатомовой микроводоросли *T. weissflogii* из коллекции кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Культуру выращивали на питательной среде f/2, приготовленной на искусственной морской воде с концентрацией соли 17 г/л. Микроводоросли культивировали в колбе Эрленмейера объемом 100 мл при непрерывном освещении с плотностью потока квантов 50 мкмоль фотонов/м²·с при температуре 23 ± 1°С и постоянном перемешивании (120 об./мин) в течение 4 сут; плотность клеток достигала ~4,7 × 10⁵ кл/мл.

В качестве токсиканта использовали антибиотик ЦФ (98% активного вещества) (Келун-Каз-

фарм, Казахстан) в форме водного раствора, который добавляли в концентрациях от 5 до 50 мг/л в свежую среду с микроводорослями. Начальная концентрация клеток микроводорослей в эксперименте составила 5 · 10⁴ кл/мл. Микроводоросли с антибиотиком в разных концентрациях экспонировали в течение 3 сут в тех же условиях, что и при выращивании маточной культуры микроводорослей. Количество клеток оценивали путем прямого счета в камере Горяева и измерения оптической плотности ($D_{677\text{нм}} - D_{730\text{нм}}$, $L = 1$ см) с помощью спектрофотометра, созданного на кафедре биофизики с использованием портативного спектрометра USB 2000 (Ocean Optics Inc., США).

Кинетические кривые флуоресценции хлорофилла (ОЛР) регистрировали с помощью флуориметра Aquapen-C 100 (Photon System Instruments, Чехия). Флуоресценцию индуцировали синим светом с длиной волны 455 нм в течение 2 с при плотности потока квантов 3000 мкмоль фотонов/м²·с. Перед регистрацией образцы адаптировали к темноте. Кривые ОЛР анализировали с помощью ЛР-теста в соответствии с опубликованной ранее работой [15], где представлены расчет параметров флуоресценции и их описание.

Быстрые световые кривые регистрировали на флуориметре Water-PAM (Walz, Германия) с импульсно-амплитудной модуляцией при последовательном увеличении интенсивности действующего света (0–1400 мкмоль фотонов/м²·с); продолжительность каждого из световых сеансов действующего света составляла 20 с. На каждом уровне освещенности квантовая эффективность ФСII ($\phi_{\text{ФСII}} = (F_M' - F_t)/F_M'$) регистрировалась при световом импульсе 3000 мкмоль/м²·с в течение 0,8 с. F_t представляет собой текущий выход флуоресценции на свету, измеренный с помощью модулирующего света (<1 мкмоль фотонов/м²·с) непосредственно перед импульсом насыщения. Относительную скорость линейного электронного транспорта (electron transport rate, далее ETR) рассчитывали как $\text{ETR} = \phi_{\text{ФСII}} \times \text{интенсивность света} \times 0,5$. Из световой кривой ETR рассчитывали следующие параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой — α) и максимальную относительную скорость электронов по электронотранспортной цепи (ETR_{max}). Обозначения и описание параметров флуоресценции представлены в соответствии с общепринятой номенклатурой [16].

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) в клетках микроводорослей оценивали путем измерения содержания продуктов взаимодействия конечных продуктов ПОЛ с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) — ТБК-активные продукты — согласно описанной ранее методике [17] с небольшими модификациями. К 200 мкл суспензии клеток водоросли добавляли 1 мл раствора 0,25%-ной ТБК в 10%-ной трихлоруксусной кислоте. Полученные

Таблица

Параметры флуоресценции диатомовой микроводоросли *T. weissflogii* на 3 сут инкубации с антибиотиком ЦФ в разной концентрации

Параметры флуоресценции	Контроль	5 мг/л	10 мг/л	25 мг/л	50 мг/л
V_J	$0,44 \pm 0,002$	$0,48 \pm 0,007^*$	$0,52 \pm 0,005^*$	$0,49 \pm 0,016^*$	$0,41 \pm 0,031$
F_V/F_M	$0,7 \pm 0,001$	$0,65 \pm 0,004^*$	$0,41 \pm 0,002^*$	$0,25 \pm 0,004^*$	$0,14 \pm 0,006^*$
F_V/F_O	$2,37 \pm 0,01$	$1,84 \pm 0,03^*$	$0,71 \pm 0,004^*$	$0,32 \pm 0,01^*$	$0,17 \pm 0,01^*$
ψ_{Eo}	$0,56 \pm 0,002$	$0,52 \pm 0,007^*$	$0,48 \pm 0,005^*$	$0,51 \pm 0,016^*$	$0,59 \pm 0,031$
$\phi_{Do} (= F_O/F_M)$	$0,3 \pm 0,001$	$0,35 \pm 0,004^*$	$0,59 \pm 0,002^*$	$0,76 \pm 0,004^*$	$0,86 \pm 0,006^*$
PI_{ABS}	$0,93 \pm 0,003$	$0,54 \pm 0,031^*$	$0,1 \pm 0,003^*$	$0,03 \pm 0,003^*$	$0,01 \pm 0,003^*$
ABS/RC	$3,18 \pm 0,02$	$3,69 \pm 0,1$	$6,55 \pm 0,08^*$	$11,86 \pm 0,5^*$	$21,2 \pm 1,94^*$
DI_o/RC	$0,94 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,04$	$3,83 \pm 0,04^*$	$8,96 \pm 0,42^*$	$18,17 \pm 1,78^*$
Площадь над кривой OJIP (Area)	326588 ± 5413	$257194 \pm 15806^*$	$367795 \pm 11967^*$	$211231 \pm 13344^*$	$195675 \pm 22077^*$
Доля KBK (OEC fraction)	1	0,90	0,64	0,46	0,32
ETR_{max}	158 ± 5	$135 \pm 6^*$	$100 \pm 1^*$	$39 \pm 6^*$	$26 \pm 0,4^*$
α	$0,23 \pm 0,004$	$0,19 \pm 0,012^*$	$0,15 \pm 0,001^*$	$0,06 \pm 0,01^*$	$0,04 \pm 0,001^*$

Примечание: * – статически значимые отличия от контроля ($p < 0,05$)

пробы инкубировали в течение 30 мин при температуре 95°C на водяной бане, после чего пробирки охлаждали 5 мин при температуре 0°C. Затем пробы центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об./мин. Поглощение света регистрировали при 532 и 600 нм. Концентрацию ТБК-активных продуктов рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Для анализа и обработки полученных данных использовали пакеты программ Origin (OriginLab Corp., США) и Statistica v.10 (StatSoft, Inc., США). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (апостериорный тест Даннетта). Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. В таблице представлены значения среднего (M) и стандартные отклонения ($\pm SD$). Для каждого исследуемого параметра выполнено три повтора, кроме эксперимента по фотоингибированию, где измерения проводились в одной повторности из-за особенностей самого эксперимента.

Результаты и обсуждение

Культуру *T. weissflogii* инкубировали в течение 3 сут без ЦФ и в присутствии антибиотика в различных концентрациях – 5, 10, 25 и 50 мг/л. В контроле концентрация клеток увеличивалась с $5 \cdot 10^4$ кл/мл до $\sim 2,8 \cdot 10^5$ кл/мл. Количество клеток *T. weissflogii* несколько увеличивалось в присутствии ЦФ в низких концентрациях на 8 и 22 % при 5 и 10 мг/л соответственно (рис. 1). Стимулирование скорости роста микроводорослей в присутствии антибиотиков в низких концентрациях отмечалось ранее в литературе [18, 19]. При воздействии ЦФ в концентрациях 25 и 50 мг/л наблюдали уменьшение концентрации клеток на 17 и 39 % соответственно (рис. 1). Наши результаты

согласуются с более ранними работами на зеленых пресноводных водорослях, в которых показано снижение скорости роста при кратковременном воздействии ЦФ в высоких концентрациях [14].

Для оценки воздействия ЦФ на фотосинтетическую активность и электронотранспортные процессы *T. weissflogii* регистрировали кривые OJIP и световые кривые флуоресценции хлорофилла. На рис. 2 представлены световые кривые ϕ_{FSC} и ETR *T. weissflogii* после 3-суточной инкубации с ЦФ. Параметр ϕ_{FSC} характеризует долю поглощенной энергии, которая используется в фотохимических реакциях в ФСП и коррелирует с квантовой эффективностью фиксации CO_2 в отсутствие фотодыхания и реакции Мелера [20]. В адаптированном к темноте объекте значение ϕ_{FSC} равно величине F_V/F_M , которая является потенциальным квантовым выходом ФСП. Начальное значение ϕ_{FSC} при 0 мкмоль фотонов/м²·с ($= F_V/F_M$) в контроле

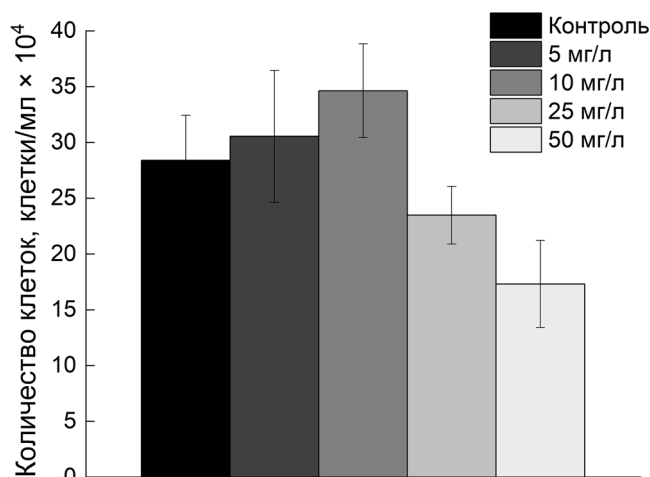


Рис. 1. Количество клеток *T. weissflogii* на 3 сут инкубации с ципрофлоксацином в разной концентрации

составило $0,71 \pm 0,003$, что свидетельствует о достаточно высокой фотосинтетической активности клеток *T. weissflogii* (рис. 2А). В присутствии ЦФ происходило значительное ($p < 0,05$) снижение F_V/F_M . Значения данного параметра при воздействии 5, 10, 25 и 50 мг/л ЦФ составили $0,64 \pm 0,01$, $0,44 \pm 0,002$, $0,21 \pm 0,02$ и $0,16 \pm 0,003$ соответственно. По мере увеличения интенсивности действующего света происходило уменьшение $\phi_{\text{ФСII}}$ как в контроле, так и при воздействии ЦФ, связанное с увеличением тепловой диссипации избыточной световой энергии, когда энергия не используется в реакциях фотосинтеза. На основании параметра $\phi_{\text{ФСII}}$ можно рассчитать относительную скорость ETR при умножении интенсивности освещения на $\phi_{\text{ФСII}}$. Кривая зависимости ETR от интенсивности освещения имеет классическую форму кривой P-I (фотосинтез-освещенность) с линейным светолимитированным участком, а также участком, где кривая выходит на плато, когда достигается световое насыщение ETR. Дальнейшее увеличение интенсивности света не влияет на скорость фотосинтеза и может даже приводить к ее уменьшению (участок динамического фотоингибирования). На рис. 2Б представлены кривые ETR водорослей *T. weissflogii* в контроле и при воздействии ЦФ. В присутствии ЦФ происходило уменьшение интенсивности ETR по сравнению с контролем. Из световой кривой ETR рассчитывали параметры, представленные в таблице. При воздействии ЦФ выявлено уменьшение максимальной скорости линейного электронного транспорта (ETR_{max}) и уменьшение угла наклона линейного участка световой кривой ETR (α), что свидетельствует о снижении утилизации поглощенной энергии в процессе фотосинтеза.

Для того чтобы оценить воздействие ЦФ на определенные участки фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) *T. weissflogii*, мы регистрировали кривые ОЖР и анализировали их с помощью JIP-теста. На рис. 3 представлены кривые ОЖР *T. weissflogii* после 3-суточной инкубации с ЦФ. В кинетике индукции флуоресценции культуры *T. weissflogii* в ответ на свет высокой интенсивности наблюдалось несколько фаз, известных как переходы O-J-I-P [15]. Начальный уровень фазы O при 50 мкс соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при «открытых» РЦ ФСII (F_O), когда все Q_A окислены. Фаза O-J обусловлена светоиндуцированным восстановлением Q_A , тогда как следующие фазы отражают, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного Q_A в результате восстановления акцепторов Q_B и пула пластохинонов (PQ). Во время фазы I-P происходит полное восстановление PQ-пула, что приводит к «закрытию» (восстановлению) РЦ ФСII (F_M). Как видно из представленного рисунка, кривые ОЖР *T. weissflogii* при воздействии ЦФ претерпевали значительные изменения. При воздействии минимальной концентрации ЦФ 5 мг/л происходило уменьшение фазы J-I-P, связанное с нарушением электронного транспорта от Q_A в PQ-пул [21]. По мере увеличения концентрации антибиотика отмечалось увеличение уровня O (F_O) и снижение уровней J, I и P (F_M). Существенное увеличение O при воздействии ЦФ может быть обусловлено возрастанием эмиссии флуоресценции хлорофилла в антенных комплексах за счет нарушения миграции энергии к РЦ, либо частичным восстановлением пула PQ в темноте, а снижение P указывает на накопление неактивных РЦ ФСII. В присутствии ЦФ выявлено

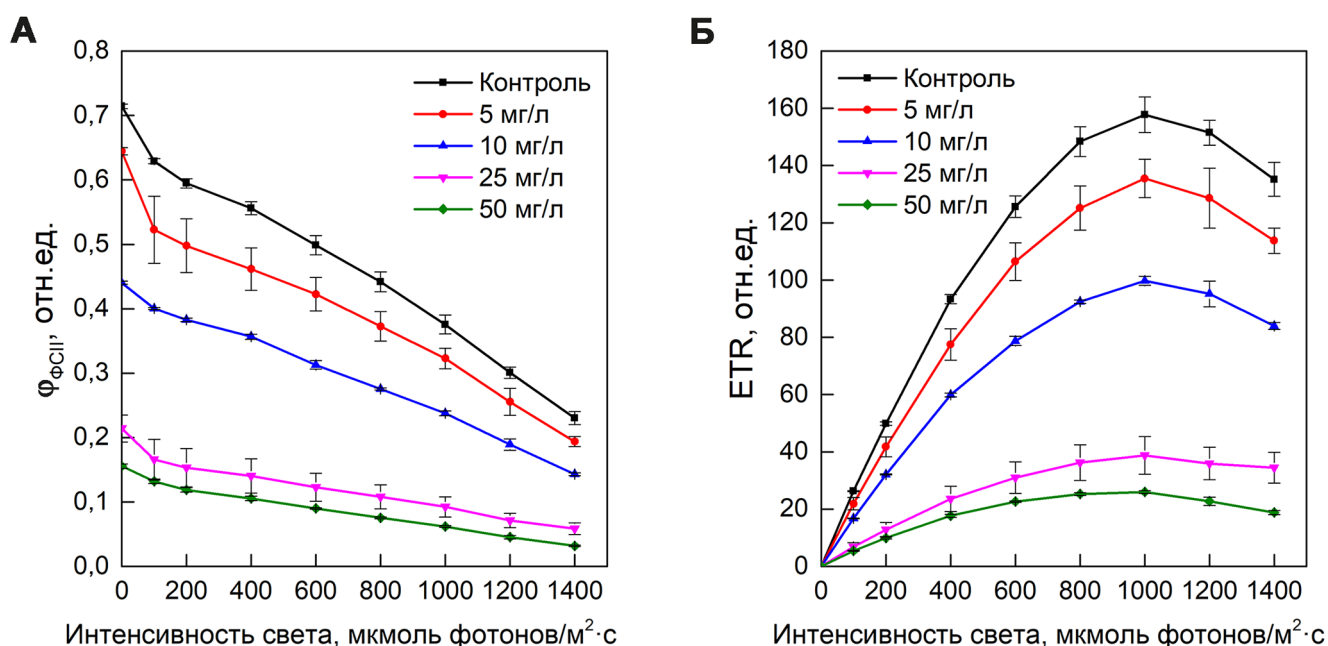


Рис. 2. Световые кривые эффективного квантового выхода ФСII ($\phi_{\text{ФСII}}$) (А) и относительного линейного электронного транспорта (ETR) (Б) *T. weissflogii* на 3 сут инкубации с ципрофлоксацином в разной концентрации

снижение площади над индукционной кривой ОЛР (параметр Area), характеризующее уменьшение размера пула электронных акцепторов до полного восстановления Q_A на акцепторной стороне ФСII (таблица). В значительной степени кривые ОЛР изменялись при воздействии ЦФ в максимальной концентрации 50 мг/л, при которой пики J, I, P на кривой практически отсутствовали, а уровень O возрастал.

Известно, что фторхинолоновые антибиотики снижают скорость выделения O_2 фотосинтезирующими клетками [22]. Активность работы кислород-выделяющего комплекса (КВК) мы оценивали по изменению выхода флуоресценции в районе 300 мкс (пик К) по формуле $V_K = (F_{300 \text{ мкс}} - F_O) / F_V$. У растений, подверженных высоким температурам и другим видам стресса, наблюдается пик К между O и J, связанный с электронным дисбалансом на акцепторной и донорной сторонах ФСII, при котором увеличивается отток электронов от P680 к акцепторам ФСII и снижается приток электронов с донорной стороны ФСII к P680⁺ [23]. Используя эту информацию, можно рассчитать долю КВК (ОЕС fraction) через

$$\frac{\left[1 - \frac{V_K}{V_J}\right] \text{ЦФ}}{\left[1 - \frac{V_K}{V_J}\right] \text{контроль}}.$$

В присутствии ЦФ у микроводорослей обнаружено уменьшение доли КВК (таблица) при воздействии ЦФ относительно контроля, что указывает на повреждающее действие ЦФ на КВК. Отношение F_V/F_O отражает эффективность донирования электрона к P680⁺ и фотосинтетическую конверсию в РЦ ФСII [24]. При воздействии ЦФ выявлено ($p < 0,05$) уменьшение F_V/F_O из-за снижения оттока электронов с донорной стороны в результате повреждения комплексов ФСII (таблица).

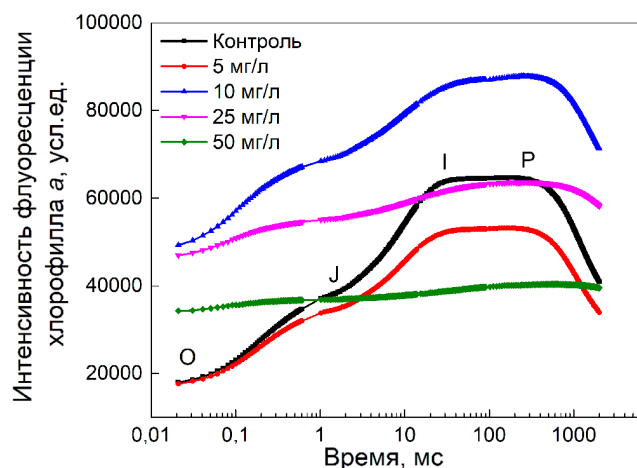


Рис. 3. Кинетические кривые флуоресценции хлорофилла (ОЛР) *T. weissflogii* на 3 сутки инкубации с ципрофлоксацином в разной концентрации

Известно, что амплитуда фазы О-Ж в бесстрессовых условиях отражает количество восстановленных («закрытых») РЦ по отношению к общему числу РЦ, которые могут быть восстановлены («закрыты») [25]. Значительный рост амплитуды фазы О-Ж (рост параметра V_J) отражает увеличение общего числа «закрытых» РЦ, неспособных к реокислению Q_A^- и восстановлению вторичного хинонового акцептора Q_B . Доказательством является действие ингибитора электронного транспорта диурона, который конкурирует со вторичным хиноном Q_B за место связывания на белке D1 [15, 16]. Это приводит к нарушению электронного транспорта между Q_A и Q_B , и восстановлению кривых ОЛР в точке J (увеличению V_J). Результаты нашего исследования показали, что ЦФ не вызывает существенного накопления восстановленных РЦ, вследствие чего электронный транспорт за пределы Q_A (ψ_{Eo}) также существенно не снижается (таблица). Отсутствие значительного воздействия ЦФ на акцепторную сторону ФСII обусловлено тем, что ЦФ не проявляет сильной конкуренции с Q_B за связывание на D1-белке в ФСII в отличие от другого антибактериального препарата – налидиксовой кислоты [26]. При воздействии ЦФ квантовая эффективность ФСII (F_V/F_M) снижалась в результате накопления поврежденных комплексов ФСII, неспособных к фотохимическому преобразованию поглощенной энергии. Снижение доли активных РЦ проявлялось в увеличении отношения размера антенны на РЦ (ABS/RC), отражающего увеличение поглощенной энергии на РЦ. Поскольку неактивные РЦ не способны к фотохимическому разделению заряда, то увеличение скорости диссипации энергии захваченных антенной фотонов вызывает увеличение параметра рассеяния поглощенной энергии на РЦ (DI_o/RC). В связи со снижением доли активных РЦ в присутствии ЦФ также наблюдали увеличение квантовой эффективности диссипации поглощенной энергии (ϕ_{Do}) в результате нарушения миграции энергии от антенных комплексов к неактивным РЦ. Наши результаты согласуются с данными ранее опубликованной работы [26], авторы которой показали *in vitro* на тилакоидах шпината, что ЦФ препятствует передаче энергии от возбужденных молекул хлорофилла антенны к РЦ ФСII и, тем самым, снижает вероятность разделения зарядов в РЦ. Параметр PI_{ABS} отражает функциональное состояние ФСII и является интегральным параметром, включающим в себя произведение таких параметров как ABS/RC, F_V/F_M и ψ_{Eo} [15]. При воздействии ЦФ выявлено существенное снижение PI_{ABS} , отражающее снижение функционального состояния ФСII – главным образом, в результате уменьшения доли активных РЦ (увеличение ABS/RC) и снижения F_V/F_M .

Некоторые антибиотики, такие как хлорамфеникол, линкомицин и левомицетин, способны блокировать цикл репарации ФСII после фотоингибирования, останавливая синтез D1-белка в хлоропласте [27]. Белок D1 является одним из ключевых белков ФСII, формирующим основу РЦ ФСII вместе с D2-белком, на которых расположены переносчики электронов. Поскольку процесс фотоингибирования, т.е. снижения фотосинтетической активности под воздействием избыточного света, во многом связан со снижением активности ФСII, то наиболее подходящими методами для оценки степени фотоингибирования являются регистрация скорости выделения O_2 клетками и параметра F_V/F_M [28]. В условиях повреждения РЦ ФСII величина F_V/F_M линейно коррелирует со скоростью выделения O_2 [29], а снижение F_V/F_M связано со степенью деградации белка D1 [30]. Для того чтобы оценить воздействие ЦФ на репарацию D1-белка *T. weissflogii* после фотоингибирования, мы инкубировали пробы с ЦФ и без него (контроль) в течение 0,5 ч на слабом свете (8 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$), затем освещали образцы светом высокой интенсивности (2000 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$) в течение 0,5 ч, после чего экспонировали образцы при 8 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$ в течение 24 ч. На рис. 4 представлено изменение параметра F_V/F_M *T. weissflogii* в контроле и в присутствии ЦФ и хлорамфеникола. Как видно из рисунка, после применения света высокой интенсивности происходило снижение F_V/F_M с 0,67 до 0,25 в контроле (свет), и с 0,66 до 0,2 в присутствии ЦФ (свет) и хлорамфеникола (свет). В пробах контроля (темнота) и ЦФ (темнота), не подвергшихся световому стрессу, величина параметра F_V/F_M не менялась в течение 24 ч инкубации. После светового воздействия пробы с контролем и антибиотиками оставляли восстанавливаться на слабом свете, регистрируя F_V/F_M через 0,5, 1, 3 и 24 ч после фотоингибирования. В присутствии ЦФ активность ФСII восстанавливалась до практически начальных значений, зарегистрированных до фотоингибирования, хотя и с некоторой задержкой по сравнению с контролем. Таким образом, показано, что ЦФ не влияет на репарацию D1-белка *T. weissflogii* после фотоингибирования в отличие от хлорамфеникола.

Различные токсиканты способны вызывать окислительный стресс в клетках микроводорослей, стимулируя образование активных форм кислорода [31]. Они инициируют ПОЛ, которое является индикатором повреждения клеточных мембран. В результате ПОЛ образуются конечные метаболиты, такие как малоновый диальдегид, реагирующие с ТБК, известные как ТБК-активные продукты. На рис. 5 представлено содержание ТБК-активных продуктов *T. weissflogii* в контроле и в присутствии ЦФ. Как видно из представленного рисунка, ЦФ в концентрации до 50 мг/л не

оказывал статистически значимого воздействия на содержание ТБК-активных продуктов, тогда как в концентрации 50 мг/л вызывал увеличение количества ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем. Наши результаты согласуются с данными, полученными на зеленых микроводорослях, для которых показали увеличение продуктов ПОЛ при воздействии ЦФ [12, 13]. Увеличение количества ТБК-активных продуктов при воздействии ЦФ в высоких концентрациях свидетельствует о том, что данный антибиотик индуцирует окислительный стресс у *T. weissflogii*, вызывая структурные и функциональные повреждения фотосинтетического аппарата.

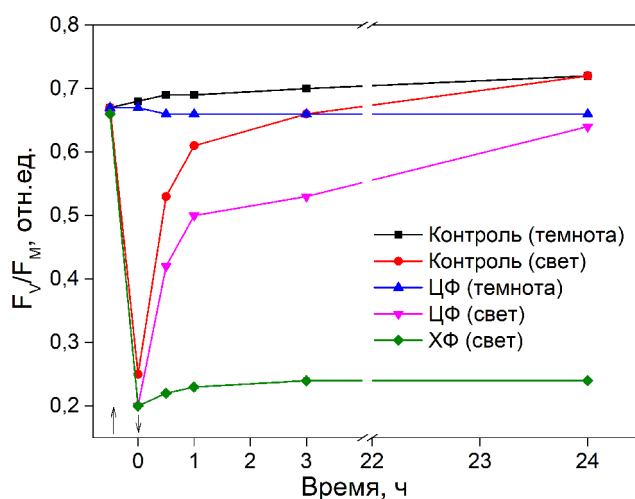


Рис. 4. Изменение параметра F_V/F_M культуры микроводоросли *T. weissflogii* в контроле и в присутствии ципрофлоксацина в концентрации 100 мг/л при повышенной освещенности 2000 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$ в течение 30 мин и последующей экспозиции на слабом свете 8 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$. Стрелками показано включение (↑) и выключение (↓) избыточного света. XФ — хлорамфеникол в концентрации 100 мг/л

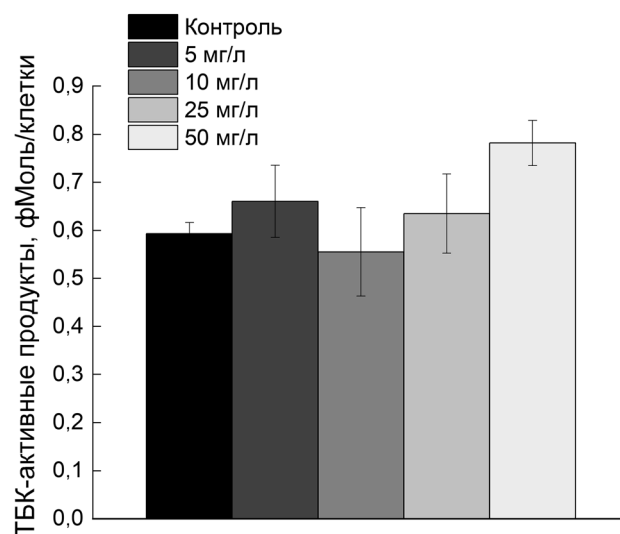


Рис. 5. Содержание ТБК-активных продуктов в клетках *T. weissflogii* на 3-и сут инкубации с ципрофлоксацином в разной концентрации

Таким образом, проведенные исследования выявили чувствительность к воздействию ЦФ морских диатомовых микроводорослей, являющихся основными продуцентами в морских экосистемах. Результаты показали, что ЦФ снижает эффективность фотосинтеза этих микроводорослей на уровне ФСII (F_V/F_M). В присутствии ЦФ наблюдали увеличение квантовой эффективности рассеяния поглощенной энергии (ϕ_{D_0}) — по-видимому, в результате нарушения миграции энергии от антенных комплексов к РЦ. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными [26], полученными *in vitro* на тилакоидах шпината, согласно которым ЦФ препятствует передаче энергии от возбужденных молекул хлорофилла антенны к РЦ ФСII и, тем самым, снижает вероятность разделения зарядов в РЦ. Возможно также снижение оттока электронов с донорной стороны ФСII (F_V/F_0 , V_K , ОЕС fraction). Эти из-

менения приводят к уменьшению доли фотохимически активных РЦ (ABS/RC) и увеличению DI_0/RC . Наши данные свидетельствуют о том, что ЦФ может индуцировать окислительный стресс у диатомовых водорослей, также вызывая структурные и функциональные повреждения фотосинтетического аппарата. Флуоресценция хлорофилла является чувствительным методом и поэтому возможно использование примененных параметров флуоресценции для анализа воздействия антибиотиков на природные популяции фитопланктона *in situ*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-11-00009). Работу проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Doorslaer X., Dewulf J., Van Langenhove H., Demeestere K. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. *Sci. Total Environ.* 2014;500–501:250–269.
2. Eregowda T., Mohapatra S. Fate of micropollutants in engineered and natural environment. *Resilience, response, and risk in water systems*. Eds. M. Kumar, F. Munoz-Arriola, H. Furumai, and T. Chaminda. Singapore: Springer; 2020:283–301.
3. Omufere L.O., Maseko B., Olowoyo J.O. Occurrence of antibiotics in wastewater from hospital and convectional wastewater treatment plants and their impact on the effluent receiving rivers: current knowledge between 2010 and 2019. *Environ. Monit. Assess.* 2022;194(4):306.
4. Lalumera G.M., Calamari D., Galli P. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere.* 2004;54(5):661–668.
5. Yang S., Carlson K.H. Solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and wastewater matrices. *J. Chromatogr. A.* 2004;1038(1–2):141–155.
6. Santos L.H.M.L.M., Araujo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 2010;175(1–3):45–95.
7. Kümmerer K. Drugs in the environment, emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources review. *Chemosphere.* 2001;45(6–7):957–969.
8. Kovalakova P., Cizmas L., McDonald T.J., Marsalek B., Feng M., Sharma V.K. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere.* 2020;251:126351.
9. Vannini C., Domingo G., Marsoni M., Mattia F.D., Labra M., Castiglioni S., Bracale M. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquat. Toxicol.* 2011;101(2):459–465.
10. Karampela I., Dalamaga M. Could respiratory fluoroquinolones, levofloxacin and moxifloxacin, prove to be beneficial as an adjunct treatment in COVID-19? *Arch. Med. Res.* 2020;51(7):741–742.
11. Hughes S.R., Kay P., Brown L.E. Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environ. Sci. Technol.* 2013;47(2):661–677.
12. Liu B.Y., Nie X.P., Liu W.Q., Snoeijis P., Guan C., Tsui M.T.K. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2011;74(4):1027–1035.
13. Nie X.P., Liu B.Y., Yu H.J., Liu W.Q., Yang Y.F. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Pollut.* 2013;172:23–32.
14. Xiong J., Kurade M.B., Kim J.R., Roh H., Jeon B. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *J. Hazard. Mater.* 2017;323(Part A):212–219.
15. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivasta A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. *Chlorophyll *a* fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, vol. 19*. Eds. G. Papageorgiou and R. Govindjee. Dordrecht: Springer; 2004:321–362.
16. Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. *Chlorophyll *a* fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, vol. 19*. Eds. G. Papageorgiou and R. Govindjee. Dordrecht: Springer; 2004:279–319.
17. Stewart R.R.C., Bewley J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 1980;65(2):245–248.
18. Yang L.H., Ying G.G., Su H.C., Stauber J.L., Adams M.S., Binet M.T. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater

microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2008;27(5):1201–1208.

19. Chen Q., Zhang L., Han Y., Fang J., Wang H. Degradation and metabolic pathways of sulfamethazine and enrofloxacin in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* treatment systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020;27:28198–28208.

20. Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989;990(1):87–92.

21. Антал Т.К., Граевская Е.Э., Маторин Д.Н., Волгушева А.А., Осипов В.А., Кренделева Т.Е., Рубин А.Б. Исследование влияния ионов метилртути и меди на первичные процессы фотосинтеза у зеленой водоросли *Chlamydomonas moewusii* с использованием параметров кинетических кривых переменной флуоресценции хлорофилла. *Биофизика.* 2009;54(4):681–687.

22. Pan X., Zhang D., Chen X., Mu G., Li L., Bao A. Effects of levofloxacin hydrochloride on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis* sp. *Chemosphere.* 2009;77(3):413–418.

23. Kalaji H.M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I.A., Cetner M.D., Łukasik I., Goltsev V., Ladle, R.J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol. Plant.* 2016;38:102.

24. Joshi M.K., Mohanty P. Chlorophyll a fluorescence as a probe of heavy metal Ion toxicity in plants. *Chlorophyll*

a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, vol. 19. Eds. G. Papageorgiou and R. Govindjee. Dordrecht: Springer; 2004:637–661.

25. Lázár D. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* 2006;33(1):9–30.

26. Aristilde L., Melis A., Sposito G. Inhibition of photosynthesis by a fluoroquinolone antibiotic. *Environ. Sci. Technol.* 2010;44(4):1444–1450.

27. Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1767(6):414–421.

28. Tyystjärvi E. Photoinhibition of Photosystem II. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2013;300:243–303.

29. Pätsikkä E., Aro E.-M., Tyystjärvi E. Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity *in vivo*. *Plant Physiol.* 1998;117(2):619–627.

30. Rintamäki E., Salo R., Lehtonen E., Aro E.-M. Regulation of D1- protein degradation during photoinhibition of photosystem II *in vivo*: phosphorylation of the D1 protein in various plant groups. *Planta.* 1995;195(3):379–386.

31. Pinto E., Sigaud-kutner T.K.S., Leitão M.A.S., Okamoto O.K., Morse D., Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 2003;39(6):1008–1018.

Поступила в редакцию 22.05.2023

После доработки 17.10.2023

Принята в печать 25.10.2023

RESEARCH ARTICLE

Primary photosynthetic processes of *Thalassiosira weissflogii* under the effect of ciprofloxacin

D.A. Todorenko^{1,*} , N.D. Sidochenko² , A.A. Baizhumanov¹ ,
L.B. Bratkovskaya³ , D.N. Matorin¹ 

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russia;

³Department of General Ecology and Hydrobiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

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

Fluoroquinolone antibiotics such as ciprofloxacin have been actively used in medical practice, including the COVID-19 pandemic, to suppress adverse bacterial infections. Widespread application and improper disposal have resulted in the ubiquity of antibiotics in the environment, which can affect aquatic life, including phytoplankton. The effect of fluoroquinolone antibiotics on the photosynthetic processes of marine diatoms, which are the main producers in marine ecosystems, has been little studied. In this work the effect of the antibiotic ciprofloxacin on the primary photosynthetic processes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* was studied. It has been shown that ciprofloxacin affects the functioning of PSII, preventing the transfer of absorbed energy from the excited antenna chlorophyll molecules to the PSII RC (ϕ_{D_0}). Under the influence of ciprofloxacin, a decrease in the efficiency of electron donation to P680⁺ (F_V/F_0), inhibition of the quantum yield of PSII (F_V/F_M), a decrease in the proportion of active RCs (ABS/RC), and an increase in the dissipation of absorbed energy in RCs (DI_0/RC) were revealed. It has been shown that the

mechanism of action of ciprofloxacin is associated with damage of PSII RC. Ciprofloxacin enhances the photosensitivity of microalgae and causes an increase in lipid peroxidation products. It is proposed to apply the parameters of chlorophyll fluorescence analyzing the effect of antibiotics on microalgae.

Keywords: *marine diatoms, OJIP curves, fluoroquinolone antibiotics, photosystem II, chlorophyll fluorescence, photoinhibition*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-11-00009.

Сведения об авторах

Тодоренко Дарья Алексеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: todorenko@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7344-0256>

Сидоченко Никита Дмитриевич — студент Российского университета дружбы народов. Тел.: 8-495-952-89-01; e-mail: ssddnikita@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0451-8718>

Братковская Любовь Борисовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-18; e-mail: profkom-bio@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0511-7983>

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

Маторин Дмитрий Николаевич — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: dnmatorin@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6164-5625>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 576.54

Чувствительность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток к короткому гипоксическому стрессу *in vitro* зависит от эффективности гомотипической коммуникации через щелевые контакты

М.И. Ездакова , Д.К. Матвеева , И.В. Андрианова , Е.Р. Андреева*

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем,
Российская академия наук, Москва, Россия

*e-mail: andreeva1564@gmail.com

Щелевые контакты (ЩК) обеспечивают метаболическую кооперацию между клетками за счет непосредственного обмена цитоплазматическими компонентами. Проведен анализ влияния короткого гипоксического стресса на эффективность коммуникации через ЩК в культивируемых митотически неактивных мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (МСК) и охарактеризована зависимость чувствительности МСК к короткому гипоксическому стрессу от работы ЩК. МСК постоянно культивировали при 20% O₂. ЩК блокировали с помощью специфического ингибитора – карбенксолона. Затем МСК с работающими или заблокированными ЩК подвергали гипоксическому стрессу (менее 0,1% O₂, 24 ч). В условиях гипоксического стресса обнаружено снижение эффективности коммуникации через ЩК. Сочетанное действие ингибитора ЩК и гипоксического стресса сопровождалось увеличением уровня активных форм кислорода по сравнению с МСК при гипоксическом стрессе. МСК с заблокированными ЩК были менее чувствительны к короткому гипоксическому стрессу, чем МСК, интегрированные в общую сеть через работающие ЩК. Это проявилось в ослаблении гипоксия-индуцированной ангиогенной активности МСК. Ангиогенные эффекты кондиционированной среды от МСК с заблокированными ЩК после гипоксического стресса были почти в два раза меньше по сравнению с МСК при гипоксическом стрессе, что связано, по-видимому, с отличиями в профиле ангиогенных медиаторов: содержание фактора роста сосудистого эндотелия уменьшилось, а фактора роста фибробластов – увеличилось при неизменном уровне моноцитарного хемоаттрактантного белка 3. Таким образом, снижение эффективности прямой коммуникации МСК–МСК оказало негативное влияние на способность индуцировать ангиогенез. Сделано заключение, что блокирование коммуникации через ЩК является негативным механизмом, нарушающим координацию ответа МСК на действие факторов микроокружения – в частности гипоксический стресс – и снижающим их функциональную пластичность.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гомотипические щелевые контакты, ингибитор, короткий гипоксический стресс, внутриклеточные компартменты, миграция, растворимые медиаторы, ангиогенез *in ovo*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-7

Введение

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются не только структурным, но и важнейшим регуляторным компонентом различных тканевых ниш [1–4]. Показано, что функциональное состояние МСК изменяется в зависимости от факторов их микроокружения, среди которых важнейшим является концентрация O₂ [5–6]. Когда концентрация O₂ в тканях снижается до уровня менее 5%, клетки вынужде-

ны адаптировать свой метаболизм и функции к таким гипоксическим условиям [7]. Острый гипоксический стресс, возникающий в участках повреждения тканей наряду с депривацией нутриентов и увеличением концентрации провоспалительных медиаторов, создает то специфическое микроокружение, в котором происходят взаимодействие клеток и реализация их функциональной активности. Известно, что гипоксический стресс (*in vitro* 0,1–5% O₂), значительно изменяет функ-

циональную активность МСК за счет активации HIF-зависимых сигнальных путей, регулирующих такие важные функции МСК, как миграция, пролиферация, метаболическая активность, продукция цитокинов, в том числе ангиогенных [8–10].

Ранее мы показали, что ингибирование работы щелевых контактов (ЩК) *in vitro* приводит к изменению функциональной активности МСК, в частности, снижению способности их секретома стимулировать рост сосудов *in ovo* и миграцию эндотелиальных клеток *in vitro* [11]. Было сделано предположение, что снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации МСК–МСК *in vivo* может негативно отразиться на их функционировании. Эффективность работы ЩК зависит от факторов микроокружения и может значительно меняться при повреждении тканей. Так, в присутствии провоспалительных медиаторов, таких как IL-1 β или TNF- α , обнаружено снижение эффективности переноса специфического красителя через ЩК [12, 13]. Короткий гипоксический стресс в культивируемых кардиомиоцитах вызывал перераспределение коннексин-43 (Cx43) из области контактов между клетками на неконтактирующие участки мембраны и снижение проводимости ЩК [14]. Гипоксия-индуцированное снижение экспрессии Cx43 опосредовалось сигнальными каскадами MAPK (mitogen-activated protein kinase) и NF- κ B (nuclear factor kappa B) в кардиомиоцитах [15]. Данных относительно влияния коротких гипоксических экспозиций на ЩК клеток стромального дифферона (МСК, периваскулярные клетки, гладкомышечные клетки, фибробласты) немного. Показано увеличение экс-

прессии гена *GJA1* (белок Cx43) в фибробластах легких после 24-часовой гипоксии (5% O₂). Аналогичный эффект описан для фибробластов 3Т3 [17]. Таким образом, в зависимости от типа клеток и уровня гипоксического стресса, ответ ЩК на гипоксический стресс может различаться, что указывает на необходимость более детального исследования этого вопроса в отношении МСК в 0,1% O₂, как в данной работе.

В настоящей работе мы определили, как эффективность гомотипической коммуникации через ЩК влияет на устойчивость/чувствительность МСК к короткому гипоксическому стрессу (0,1% O₂, 24 ч).

Материалы и методы

В работе использовали иммортализованные МСК (AsC52telo) и эндотелиальные клетки (ЭК) EA.hy926 (ATCC, США). Клетки культивировали в среде α -MEM (Gibco, США; для МСК) и DMEM/F12 (Gibco, США; для ЭК) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 1% раствора пенициллина/стрептомицина (конечная концентрация в среде составила 100 ед./мл и 100 мг/мл) (ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) при 20% O₂ (общепринятые стандартные условия культивирования (95% воздуха (20% O₂) + 5% CO₂)) в CO₂-инкубаторе MCO-17AI (Sanyo, Япония). Схема эксперимента представлена на рис. 1. МСК рассеивали с плотностью 2500 кл./см² и культивировали согласно стандартному протоколу до достижения 80–90% монослоя (рис. 1А). Затем среду заменяли на свежую, содержащую 1,5 мкг/мл митомицина С (Sigma-

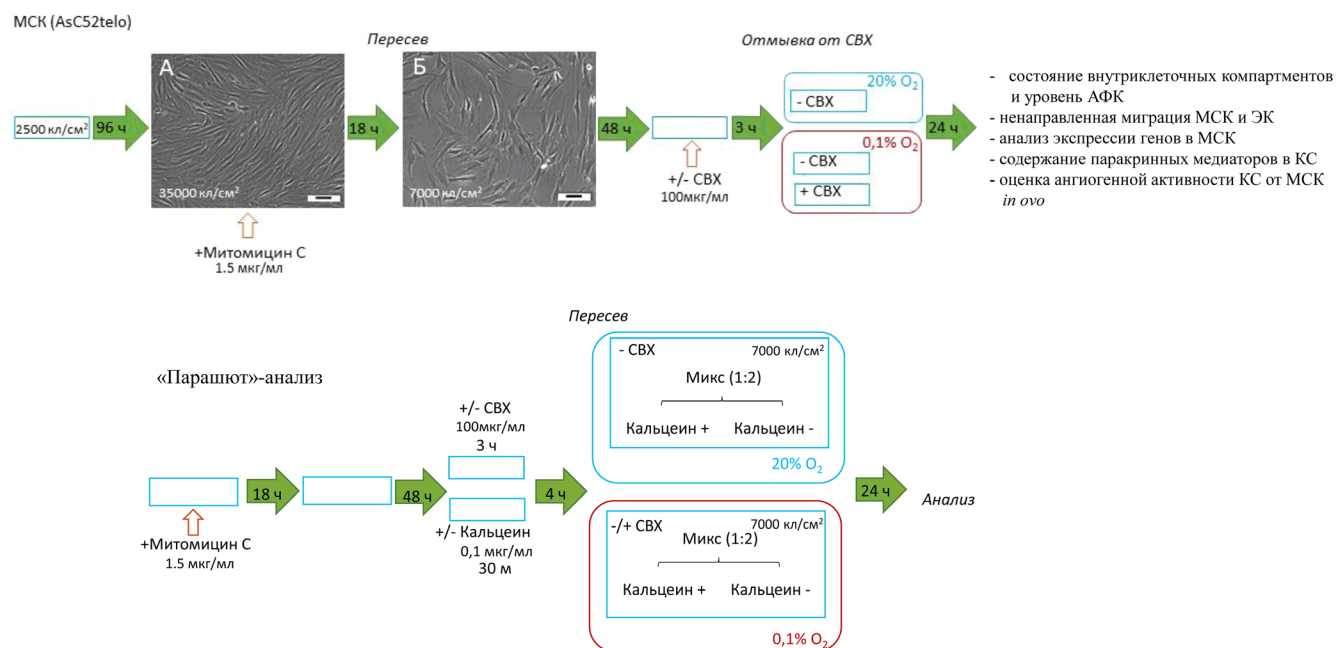


Рис. 1. Схема эксперимента. А – монослой МСК перед добавлением митомицина С. Б – предмонослой МСК, обработанных митомицином С. Репрезентативные изображения: фазовый контраст, масштабный отрезок – 50 мкм. Микс – смешанная культура кальцеин-содержащих и неокрашенных клеток.

Aldrich, США). Через 18 ч клетки промывали, открепляли от подложки и рассеивали в чашки Петри диаметром 35 мм в полной ростовой среде из расчета 7000 кл./см², что позволило получить предмонослой (рис. 1Б). Ранее мы показали, что при такой плотности посева клетки в образовавшемся предмонослое образуют ЩК, о чем свидетельствовала экспрессия белка ЩК Сх43 [18]. Через 48 ч к части МСК для блокирования ЩК добавляли специфический ингибитор — карбеноксолон (CBX, carbenoxolone) (Sigma-Aldrich, США) — в концентрации 100 мкг/мл на 3 ч. Затем МСК с заблокированными или работающими ЩК подвергали короткому гипоксическому воздействию — 0,1% O₂, 24 ч в гипоксической камере (кат. №: 27310) (Stem Cell Technologies, Канада), оснащенной кислородным датчиком ПКГ-4 (Эксис, Россия). Гипоксическая газовая смесь (95% N₂ + 5% CO₂) была приобретена в фирме «ООО ГазЗачас» (Россия). В качестве группы сравнения использовали МСК, постоянно культивируемые при 20% O₂. Перед началом экспериментов с гипоксическим стрессом во всех группах МСК меняли среду на свежую. После окончания эксперимента собирали кондиционированную среду (КС).

Эффективность работы ЩК, состояние клеточных органелл, уровень активных форм кислорода (АФК), жизнеспособность оценивали методом проточной цитофлуориметрии (Cytotflex S, Beckman Coulter, США) с использованием соответствующих флуоресцентных проб. Коммуникацию через ЩК определяли с помощью «парашют»-анализа (parashute assay) (рис. 1) [19]. Для этого использовали кальцеин-АМ. Этот vitalный краситель проникает в клетки и подвергается гидролизу под действием эстераз. Образующийся кальцеин не может выйти из клетки, но способен к перетеканию в соседние клетки через ЩК. Часть МСК, перед сокультивированием окрашивали кальцеином-АМ (0,1 мкг/мл, Invitrogen, США), затем рассаживали вместе с неокрашенной популяцией клеток, часть которых обрабатывали/не обрабатывали СВХ, с плотностью 7000 кл./см². Далее МСК, содержащие кальцеин, и неокрашенные МСК (1:2) совместно культивировали в течение 24 ч. Клетки открепляли Аккутазой (Sigma, США). Увеличение количества окрашенных МСК свидетельствовало о переносе кальцеина через ЩК. Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест «анексин V — йодид пропидия» (ANNEXIN V-FITC Kit, Beckman Coulter, США). Массу митохондрий оценивали при помощи потенциал-независимого митохондриального зонда MitoTracker Green (15 нг/мл, Invitrogen, США). Трансмембранный потенциал митохондрий определяли с помощью зонда JC-1 (1,5 нг/мл, Invitrogen, США). АФК в клетках выявляли, используя зонд CM-H2DCFDA (1 мкл/мл, Invitrogen, США). Состояние лизосомального

компартамента оценивали при помощи зонда LysoTracker Green DND26 (0,5 мкл/мл, Invitrogen, США). Окрашивание МСК флуоресцентными зондами проводили согласно протоколам производителя (Invitrogen, США). В качестве параметра для оценки данных проточной цитофлуориметрии использовали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) на клетку.

Влияние КС от МСК на ненаправленную миграцию МСК и ЭК оценивали в модели экспериментальной «раны» монослоя по средней площади миграции в течение 6 ч после нанесения раны [11]. МСК анализировали на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-U (Nikon, Япония), с использованием программы NIS-elements AR 3.21 (Nikon, Япония).

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени с помощью соответствующих праймеров (Qiagen, США) на приборе MX300P (Stratagen, США). Клетки с чашки 35 мм, с плотностью 7000 кл./см², лизировали с помощью реагента QIAzol (Qiagen, США). Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США) по уровню поглощения при длине волн 260/280 нм. Далее на матрице РНК синтезировали кДНК с использованием Quantitech Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для определения уровня экспрессии генов использовали набор реактивов для проведения полимеразной цепной реакции в присутствии SYBR Green 1 (Евроген, Россия). Ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (*HPRT*) был использован в качестве референсного. Транскрипция *HPRT* осталась постоянной при гипоксическом стрессе, а также воздействию СВХ и митомицина, что позволяет использовать его для определения относительного изменения уровня экспрессии целевых генов. Подготовка проб была одинаковой для всех групп, в том числе в анализ было взято одинаковое количество кДНК. Специфичность проводимой реакции определяли с помощью анализа кривой плавления продуктов амплификации в диапазоне от 55°C до 95°C с шагом в 1 градус.

Содержание паракринных медиаторов в образцах КС определяли с помощью мультиплексного анализа (Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel — Premixed 41 Plex — Immunology Multiplex Assay; Merck, Germany). Условия посадки и культивирования клеток были одинаковыми во всех группах: плотность 7000 кл./см², чашки диаметром 35 мм, объем среды 2 мл.

Оценку ангиогенной активности проводили с использованием модели *in ovo* (формирование сосудистой сети в хориоаллантоисной оболочке (ХАО) эмбриона японского перепела *Coturnix coturnix japonica*) [20].

В качестве характеристики полученных выборок использовали среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0, используя непараметрический критерий Манна-Уитни (для малых и средних выборок, $n \leq 30$) при выбранном уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

К настоящему времени уже опубликованы результаты несколько исследований, демонстрирующих зависимость функциональной активности клеток от их плотности в культуре [19, 21–22].

Основной проблемой, с которой сталкиваются исследователи в таких экспериментах, является исходно разное функциональное состояние клеток в зависимости от фазы клеточного роста. Для того чтобы преодолеть это затруднение, мы разработали протокол с использованием антибиотика митомицина С, который обладает цитостатическим действием, образуя поперечные сшивки между нитями ДНК.

Среди МСК, культивируемых при 20% O_2 , а также после гипоксического стресса наблюдался низкий уровень клеточной гибели. По данным проточной цитометрии, при 20% O_2 процент живых клеток составил $95,9 \pm 0,7$. МСК после гипоксического стресса и блокирования ЩК сохраняли высокий уровень жизнеспособности – $94,2 \pm 0,3\%$ и $96,2 \pm 0,8\%$ соответственно. Таким образом, МСК достаточно устойчивы к гипоксическому стрессу. Это позволяет предполагать, что в организме при ишемических повреждениях эти клетки могут выжить и участвовать в ремоделировании ткани после ишемической катастрофы.

Эффект депривации O_2 оценивали по изменению нескольких гипоксия-зависимых параметров. По сравнению с МСК при 20% O_2 , в МСК в обеих «гипоксических» группах (0,1% O_2 – СВХ и 0,1% O_2 + СВХ) была достоверно повышена транскрипция переносчика глюкозы *GLUT1* (таблица), что может указывать на увеличение гликолитической составляющей в метаболизме АТФ. Увеличение уровня фактора роста сосудистого эндотелия

(VEGF, vascular endothelial growth factor) является одним из наиболее заметных проявлений ответа клетки на гипоксический стресс [23]. Значимое увеличение содержания VEGF в кондиционированной среде от МСК в обеих группах является дополнительным подтверждением эффекта гипоксического стресса (таблица).

Эффективность коммуникации МСК через ЩК анализировали с помощью «парашют»-анализа с использованием проточной цитофлуориметрии (рис. 2). Для этого неокрашенные МСК (70% популяции) и МСК, содержащие кальцеин (30% популяции), объединяли и совместно культивировали в соответствии с дизайном эксперимента. Гистограммы распределения неокрашенных и окрашенных кальцеином МСК представлены на рис. 2А и 2Б соответственно. Для полуколичественной оценки уровня кальцеина в МСК использовали показатель СИФ на клетку. После взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК при 20% O_2 в течение 24 ч сформировалась популяция, в которой все клетки содержали кальцеин (рис. 2В). Распределение клеток по интенсивности флуоресценции было близким к нормальному. Значения СИФ были ниже, чем в исходных окрашенных клетках, но существенно выше, чем в неокрашенных МСК, что свидетельствовало о перетекании кальцеина через ЩК из окрашенных клеток в неокрашенные.

После культивирования МСК при 0,1% O_2 в течение 24 ч выявлено подавление эффективности переноса красителя через ЩК (рис. 2Г). В отличие от МСК при 20% O_2 , часть окрашенных МСК сохранила исходную СИФ (правый пик на гистограмме). Левый пик представлен исходно неокрашенными МСК, в которые перетек кальцеин, СИФ в этих клетках была существенно ниже.

Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в популяции после взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК с заблокированными ЩК были представлены кривыми с двумя пиками (рис. 2Д). Часть окрашенных МСК, составлявшая примерно треть популяции, имела исходно высокий уровень флуоресценции, соответствующий значениям

Таблица

Влияние короткого гипоксического стресса и блокирования щелевых контактов на транскрипционную активность МСК и продукцию VEGF

Праймеры/факторы роста	-CBX 20% O_2	-CBX 0,1% O_2	+CBX 0,1% O_2
<i>GLUT1</i>	$6,7 \pm 0,2$	$12,2 \pm 0,9^*$	$14,9 \pm 0,9^*$
<i>GJA1</i>	$1,8 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1^*$
<i>TUBB</i>	$139,7 \pm 11,2$	$85,1 \pm 12,3^*$	$72,1 \pm 3,7^*$
<i>RHOA</i>	$130,1 \pm 21,3$	$89,1 \pm 16,1^*$	$125,7 \pm 11,3$
<i>ROCK1</i>	$2,9 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,9^*$	$2,4 \pm 0,9$
VEGF, пкг/мл	$200,4 \pm 16,0$	$352,2 \pm 38,1^*$	$276,3 \pm 41,0^*$

Примечания: данные экспрессии генов нормализованы на значения экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1* и представлены как $M \pm SD$. * – значимое отличие от значения эксперимента «-CBX 20% O_2 », $p < 0,05$

окрашенных клеток до начала эксперимента (рис. 2Б). Другие две трети популяции были окрашены гораздо слабее. Это позволяет утверждать, что ЩК были заблокированы.

По сравнению с МСК при 20% O_2 в МСК с заблокированными ЩК после гипоксического стресса была существенно ниже транскрипция гена *GJA1*, кодирующего Сх43 — представитель семейства белков ЩК (рис. 2Д), что может быть причиной описанного выше ухудшения коммуникации через ЩК.

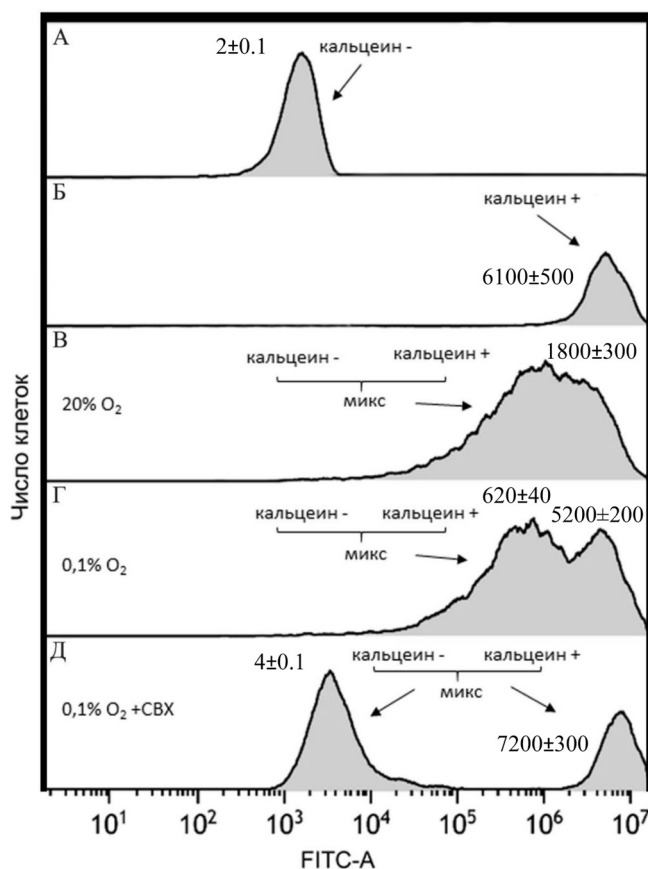


Рис. 2. Оценка эффективности межклеточной коммуникации МСК через щелевые контакты. Репрезентативные гистограммы. «Парашют»-анализ, проточная цитофлуориметрия. А — распределение клеток по интенсивности флуоресценции в суспензии неокрашенных МСК; Б — распределение клеток по интенсивности флуоресценции в суспензии окрашенных кальцеином МСК перед началом совместного культивирования; В — Распределение МСК с различной интенсивностью флуоресценции после 24 ч взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК при 20% O_2 (на рисунке эта смешанная популяция клеток обозначена как «микс»); Г — распределение МСК с различной интенсивностью флуоресценции после 24 ч взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК при 0,1% O_2 (микс). Часть окрашенных МСК сохранила исходную интенсивность флуоресценции (правая часть пика). Левая часть пика представлена исходно неокрашенными МСК, в которые перетек кальцеин; Д — распределение МСК с различной интенсивностью флуоресценции после 24 ч взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК при 0,1% O_2 при блокировании ЩК (микс), СВХ — карбенексзон. На гистограммах приведены СИФ клеточных популяций (усл. ед. $\times 10^3$)

Известно, что депривация O_2 вызывает стресс митохондрий [24]. Для характеристики митохондриального компартмента полуколичественно определяли интенсивность флуоресценции селективного красителя митохондрий — MitoTracker Green FM (Invitrogen, США). Данный краситель избирательно аккумулируется в матриксе митохондрий, где ковалентно связывается с митохондриальными белками, реагируя со свободными тиоловыми группами остатков цистеина [25–26]. Накопление этого флуоресцентного маркера в матриксе митохондрий прямо пропорционально их массе и не зависит от мембранного потенциала органелл [25], что дает возможность судить об относительном содержании митохондрий в клетке или «массе митохондрий». Кроме того, для оценки трансмембранного потенциала митохондрий использовали катионный карбоцианиновый краситель JC-1, накопление которого потенциал-зависимо. При высоком значении потенциала митохондриальной мембраны краситель образует J-агрегаты, которые имеют красную флуоресценцию ($E_x = 585$ нм, $E_m = 590$ нм). При снижении потенциала (деполяризации) мембраны краситель остается в виде мономера, обладающего зеленой флуоресценцией ($E_x = 514$ нм, $E_m = 529$ нм). Соотношение красной/зеленой флуоресценции JC-1 зависит только от потенциала митохондриальной мембраны, но не от других факторов, таких как размер, форма и плотность митохондрий.

В обеих группах МСК проточная цитофлуориметрия выявила относительное увеличение массы митохондрий (рис. 3А) и содержания внутриклеточных АФК (рис. 3Б). При этом трансмембранный потенциал митохондрий не изменился (рис. 3В). Увеличение СИФ MitoTracker Green FM в МСК может свидетельствовать об увеличении массы (числа) митохондрий, подобный эффект описан ранее [24].

Зависимый от pH зонд LysoTracker Green был использован для оценки функционального состояния лизосом и аутофагосом. Специфическое окрашивание органелл с низким pH позволяет анализировать процессы аутофагии. СИФ МСК с работающими и заблокированными ЩК после гипоксического стресса достоверно не отличались от СИФ в МСК при 20% O_2 (рис. 3Г). Эти результаты можно оценивать как свидетельство устойчивости лизосомального компартмента МСК к острому гипоксическому стрессу вне зависимости от того, работают в них ЩК или нет.

Через 6 ч после повреждения монослоя МСК эффективность закрытия экспериментальной «раны» во всех группах была сходной и составляла 100%, т.е. острый гипоксический стресс (как сам по себе, так и в сочетании с блокированием ЩК) не повлиял на способность МСК к миграции. Анализ активности генов, связанных с миграцией,

выявил значимое снижение уровня транскрипции *TUBB*, кодирующего белок цитоскелета тубулин, а также генов *RHOA* и *ROCK1*, кодирующих молекулы сигнального пути Rho/ROCK, в МСК после гипоксического стресса (таблица). При этом в МСК с заблокированными ЩК активность генов регуляторных молекул *RHOA* и *ROCK1* не отличалась от этого показателя для МСК, постоянно культивируемых при 20% O_2 (таблица). Полученные данные можно интерпретировать следующим образом. Влияние гипоксического стресса на ассоциированные с миграцией структуры определялось только на транскрипционном уровне. Сходные результаты по снижению активности гена-регулятора миграции – *ROCK1* – в МСК после острого гипоксического стресса мы описали ранее [10]. Отмена влияния гипоксического стресса на транскрипцию генов-регуляторов в МСК с заблокированными ЩК дает основания полагать, что уровень межклеточной интеграции через ЩК может быть одним из факторов, определяющих миграционную активность МСК.

Ангиогенные эффекты КС от МСК с работающими/заблокированными ЩК после гипоксического стресса оценивали по влиянию на нена-

правленную миграцию в экспериментальной «ране» в монослое ЭК и в модели формирования сосудистой сети в ХАО эмбриона перепела ($n = 4$) (рис. 4А). Эффективность закрытия раны ЭК была одинаковой при культивировании в КС от МСК всех экспериментальных групп и составила 100% ($n = 4$).

По сравнению с КС от МСК при 20% O_2 , КС от МСК с работающими ЩК после гипоксического стресса вызывала четырехкратное увеличение общего числа сосудов в ХАО, причем этот эффект был достигнут только за счет увеличения числа ветвей (рис. 4Б). Эффект гипоксической стимуляции был снижен в случае использования КС от МСК с заблокированными ЩК. Происходило подавление роста ветвей (рис. 4Б).

После гипоксического стресса в КС от МСК с работающими ЩК выявлено увеличение в 1,75 раза уровня основного медиатора ангиогенеза – VEGF (vascular endothelial growth factor), в случае МСК с заблокированными ЩК – в 1,4 раза (рис. 4В). Уровень другого ангиогенного медиатора – фактора роста фибробластов (FGF-2, fibroblast growth factor 2) – напротив, снижался после депривации O_2 , но значимо

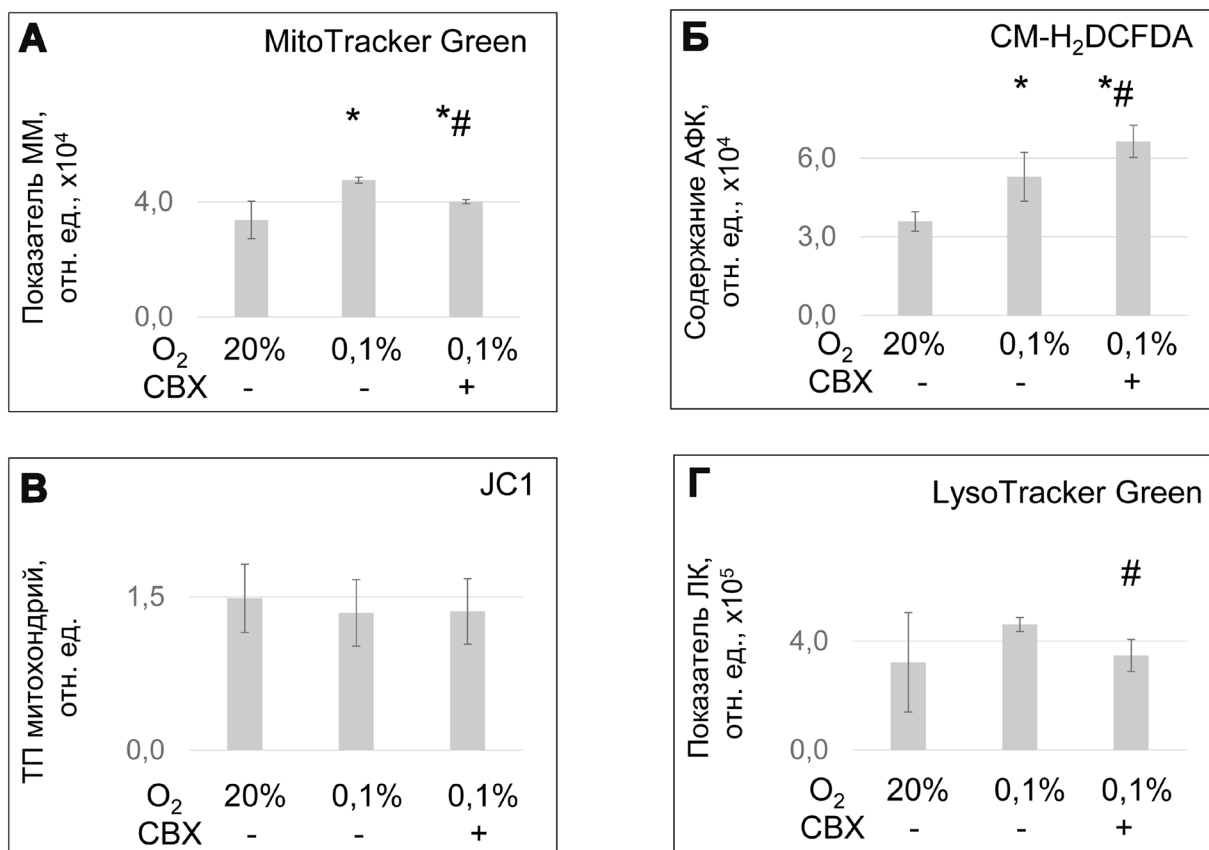


Рис. 3. Влияние короткого гипоксического стресса и блокирования щелевых контактов на состояние внутриклеточных компарментов и уровень АФК в МСК. Данные проточной цитометрии представлены как СИФ: митохондриально-селективных красителей MitoTracker Green (А) и JC-1 (В); АФК-чувствительного зонда CM-H₂DCFDA (Б) и pH-чувствительного лизосомного красителя LysoTracker Green (Г). Среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$), $n = 4$.

* – значимое отличие от показателя при 20% O_2 , $p < 0,05$.

– значимое отличие показателя при «+CBX 0,1% O_2 » от значений при «-CBX 0,1% O_2 », $p < 0,05$.

CBX – карбениксолон

повышался до уровня, характерного для МСК, выращиваемых при 20% O₂, в случае блокирования ЩК (рис. 4Г). В КС от МСК после гипоксической экспозиции независимо от блокирования ЩК значимо снизилось содержание еще одного ангиогенного фактора — моноцитарного хемоаттрактантного белка 3 (MCP-3, monocyte chemoattractant protein 3) (рис. 4Д). Такое изменение секреторного профиля, по-видимому, и определило уменьшение ангиогенной активности КС от МСК с ингибированными ЩК после гипоксического стресса.

ЩК являются одним из самых «высокотехнологичных» видов межклеточной коммуникации, позволяя обмениваться метаболитами и сигнальными молекулами, минуя внеклеточное пространство. Таким образом может осуществ-

ляться модификация активности клеток в пределах популяции [27–28].

Недавно мы показали, что ингибирование ЩК вызывает стресс внутриклеточных компартментов и изменение профиля секретируемых медиаторов, ставшее причиной снижения ангиогенной активности КС от таких МСК в модели ангиогенеза *in ovo* [11]. Мы предположили, что снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации может рассматриваться как стрессовая ситуация, приводящая к ухудшению интеграционной целостности клеточной системы МСК в локальных тканевых депо и снижению их проангиогенных свойств. В связи с этим нам представлялось актуальным проверить, как факторы микроокружения модулируют активность МСК при разобщении этих прямых межклеточных коммуникаций.

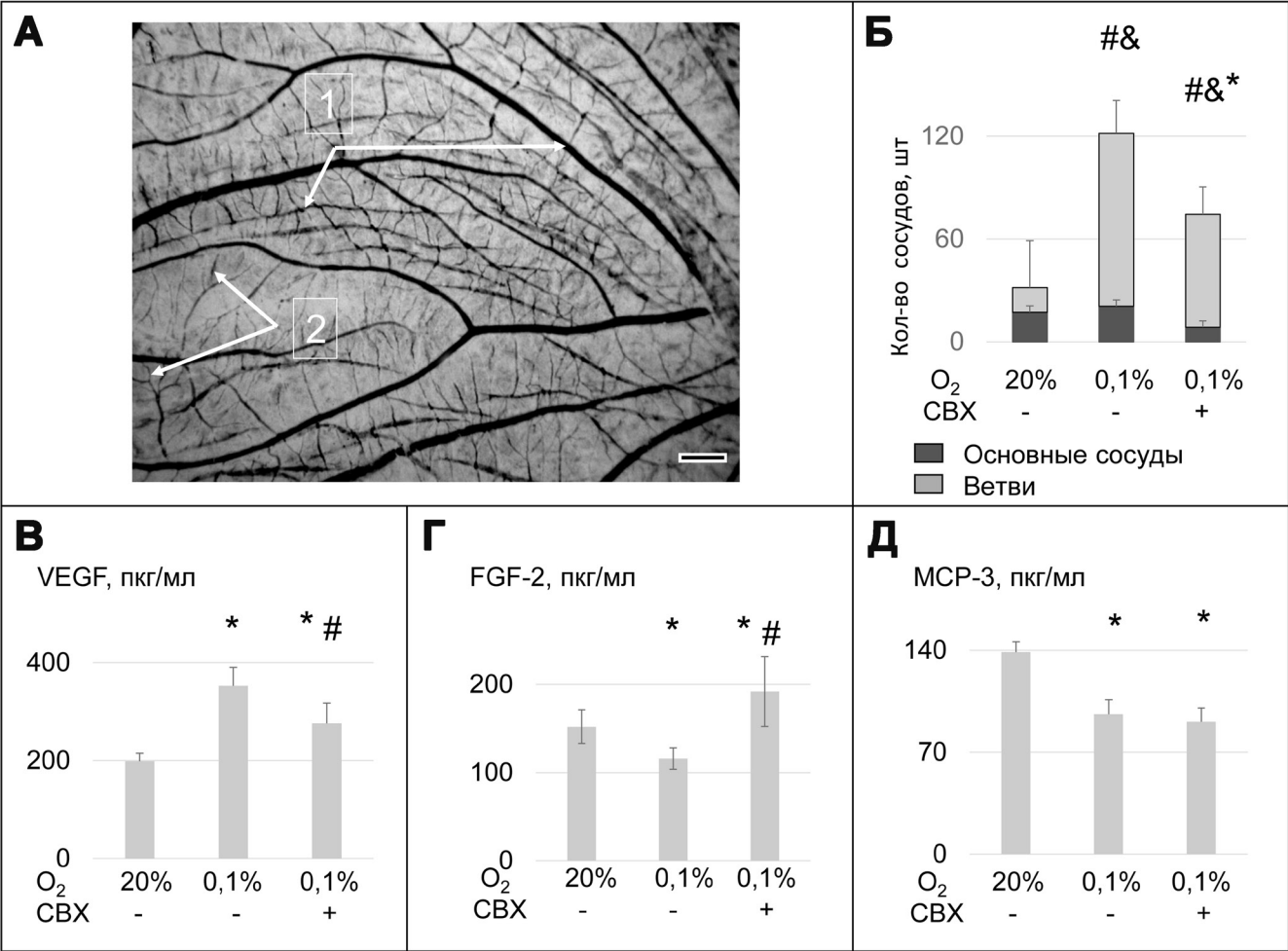


Рис. 4. Влияние короткого гипоксического стресса и блокирования щелевых контактов на ангиогенную активность кондиционированной среды от МСК *in ovo*. **А** — хориоаллантоисная оболочка (ХАО) эмбриона перепела. Микроскопия в светлом поле. Репрезентативная микрофотография. 1 — основные сосуды; 2 — ветви. Масштабный отрезок — 1 мм. **Б** — количество сосудов в ХАО. Данные представлены как прирост по сравнению с контролем (полная ростовая среда). CBX — карбенексолон.

— значимое отличие общего количества сосудов от показателя при 20% O₂, p < 0,05

& — значимое отличие числа ветвей от показателя при 20% O₂, p < 0,05

* — значимое отличие числа ветвей +CBX 0,1% O₂ от показателя при -CBX 0,1% O₂, p < 0,05.

В–Д — содержание ангиогенных медиаторов в кондиционированной среде МСК. Данные представлены как M ± SD, n = 4. * — p < 0,05. CBX — карбенексолон.

* — значимое отличие от показателя при 20% O₂, p < 0,05

— значимое отличие показателя при +CBX 0,1% O₂ от показателя при -CBX 0,1% O₂, p < 0,05.

Депривация O_2 является обязательным компонентом одного из основных факторов микроокружения в областях повреждения [29]. К настоящему времени уже накоплен значительный массив данных, показывающих, что острый гипоксический стресс может быть индуктором репаративного потенциала МСК, в частности, их «трофической» активности [29–30].

В нашей работе после гипоксического стресса КС от МСК с работающими ЩК значимо стимулировала формирование сети в ХАО. Усиление ангиогенной активности МСК после коротких гипоксических экспозиций является хорошо исследованным феноменом и обуславливается проангиогенным характером профиля растворимых медиаторов [23, 30]. В КС от МСК с работающими ЩК значительно увеличился уровень основного ангиогенного медиатора VEGF, играющего центральную роль в стимуляции пролиферации и миграции ЭК, при этом понизилось содержание FGF-2 и MCP-3, которые стимулируют миграцию МСК. Предположительно с таким изменением профиля хемокинов связан прирост сосудистой сети почти исключительно за счет увеличения числа ветвей [31].

Мы обнаружили, что сам по себе гипоксический стресс может ухудшать работу ЩК, что проявилось в снижении эффективности переноса ЩК-специфического красителя. Тем не менее, сохраняющаяся связь через ЩК, по-видимому, обеспечивала достаточный уровень интеграции, что позволило МСК сохранить свою функциональную активность при ответе на гипоксический стресс.

МСК с заблокированными ЩК оказались менее чувствительными к короткому гипоксическому стрессу, чем МСК, интегрированные в общую сеть. Нарушение щелевых контактов нивелировало позитивный эффект повышения ангиогенного потенциала в МСК после депривации O_2 . Ослабление ангиогенных свойств МСК с заблокированными ЩК подтвердилось меньшим изменением в митохондриальном и лизосомальном компартментах в ответ на гипоксический стресс. Ангиогенные эффекты КС от МСК с заблокированными

ЩК при гипоксии были почти в два раза слабее, чем эффекты КС от МСК, культивируемых при нормоксии, что связано, по-видимому, с различиями в профиле ангиогенных медиаторов: содержание VEGF уменьшилось, а FGF-2 — увеличилось при неизменном уровне MCP-3. Ранее после ингибирования ЩК в стромальных клетках эндометрия было показано снижение продукции VEGF [32]. Известно, что один из механизмов ангиостимулирующего действия VEGF связан с разрушением ЩК между эндотелиальными клетками. Соответственно, уменьшение содержания этого фактора роста может подавлять ангиогенез [33].

В заключение необходимо отметить, что степень функциональной гомотипической интеграции в тканевых депо может играть важную роль в реализации функций МСК как в физиологическом ремоделировании, так и при повреждении тканей. Работающие ЩК увеличивают эффективность клеточной сети, когда клетки реагируют как своего рода синцитий. Это наблюдается в таких высокоинтегрированных системах, как поперечнополосатые скелетные мышцы и миокард. Можно предположить, что сходные ЩК-опосредованные механизмы обеспечивают функционирование сети МСК в локальных тканевых депо. Известно, что такие негативные факторы микроокружения, как гипергликемия [34], повышенный уровень воспалительных медиаторов [12–13, 35] и, как мы показали, короткий гипоксический стресс подавляют коммуникацию через ЩК. Можно полагать, что блокирование коммуникации через ЩК является негативным фактором, нарушающим координацию ответа МСК на действие факторов микроокружения — в частности, гипоксический стресс — и снижающим их функциональную пластичность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00075). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных, а также с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Паракринная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и ее особенности в условиях гипоксии. *Физиол. чел.* 2013;39(3):104–113.
2. Murray I.R., Péault B. Q&A: mesenchymal stem cells—where do they come from and is it important? *BMC Biol.* 2015;13:99.
3. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl. Med.* 2017;6(6):1445–1451.
4. Tan L., Liu X., Dou H., Hou Y. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity

by the microenvironment—specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. *Genes Dis.* 2020;9(2):296–309.

5. Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р., Григорьев А.И. Роль кислорода как физиологического фактора в проявлении функциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. *Физиол. чел.* 2012;38(4):121–130.
6. Buravkova L.B., Andreeva E.R., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? *Mitochondrion.* 2014;19(Part A):105–112.

7. Pulido-Escribano V., Torrecillas-Baena B., Camacho-Cardenosa M., Dorado G., Gálvez-Moreno M.Á., Casado-Díaz A. Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World J. Stem Cells*. 2022;14(7):453–472.
8. Antebi B., Rodriguez L.A., Walker K.P., Asher A.M., Kamucheka R.M., Alvarado L., Mohammadipoor A., Cancio L.C. Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2018;9(1):265.
9. Ishiuchi N., Nakashima A., Doi S., Yoshida K., Maeda S., Kanai R., Yamada Y., Ike T., Doi T., Kato Y., Masaki T. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):130.
10. Udartseva O.O., Lobanova M.V., Andreeva E.R., Buravkov S.V., Ogneva I.V., Buravkova L.B. Acute hypoxic stress affects migration machinery of tissue O 2-adapted adipose stromal cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7260562.
11. Ездакова М.И., Матвеева Д.К., Андреева Е.Р. Гомотипическая регуляция функциональной активности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток: роль щелевых контактов. *Цитология*. 2022;64(6):523–533.
12. Dorshkind K., Green L., Godwin A., Fletcher W.H. Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal cells. *Blood*. 1993;82(1):38–45.
13. Chanson M., Derouette J.P., Roth I., Foglia B., Scerri I., Dudez T., Kwak B.R. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005;1711(2):197–207.
14. Danon A., Zeevi-Levin N., Pinkovich D.Y., Michaeli T., Berkovich A., Flugelman M., Eldar Y.C., Rosen M.R., Binah O. Hypoxia causes connexin 43 internalization in neonatal rat ventricular myocytes. *Gen. Physiol. Biophys.* 2010;29(3):222–233.
15. Wu X., Huang W., Luo G., Alain L.A. Hypoxia induces connexin 43 dysregulation by modulating matrix metalloproteinases via MAPK signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 2013;384(1–2):155–162.
16. McNair A.J., Wilson K.S., Martin P.E., Welsh D.J., Dempsey Y. Connexin 43 plays a role in proliferation and migration of pulmonary arterial fibroblasts in response to hypoxia. *Pulm. Circ.* 2020;10(3):2045894020937134.
17. Glass B.J., Hu R.G., Phillips A.R., Becker D.L. The action of mimetic peptides on connexins protects fibroblasts from the negative effects of ischemia reperfusion. *Biol. Open*. 2015;4(11):1473–1480.
18. Ездакова М.И., Зорникова К.В., Буравков С.В., Андреева Е.Р. Функциональная активность непродлиферирующих мезенхимных стромальных клеток, культивируемых в различной плотности. *Клеточные технол. биол. мед.* 2020(4):247–254.
19. Talbot J., Brion R., Lamora A., Mullard M., Morice S., Heymann D., Verrecchia F. Connexin43 intercellular communication drives the early differentiation of human bone marrow stromal cells into osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* 2018;233(2):946–957.
20. Udartseva O.O., Zhidkova O.V., Ezdakova M.I., Ogneva I.V., Andreeva E.R., Buravkova L.B., Gollnick S.O. Low-dose photodynamic therapy promotes angiogenic potential and increases immunogenicity of human mesenchymal stromal cells. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2019;199:111596.
21. Andreeva E., Andrianova I., Rylova J., Gornostayeva A., Bobyleva P., Buravkova L. Proinflammatory interleukins' production by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: the impact of cell culture conditions and cell-to-cell interaction. *Cell Biochem. Funct.* 2015;33(6):386–393.
22. Wiesner M., Berberich O., Hoefner C., Blunk T., Bauer-Kreisel P. Gap junctional intercellular communication in adipose-derived stromal/stem cells is cell density-dependent and positively impacts adipogenic differentiation. *J. Cell. Physiol.* 2018;233(4):3315–3329.
23. Paquet J., Deschepper M., Moya A., Logeart-Avramoglou D., Boisson-Vidal C., Petite H. Oxygen tension regulates human mesenchymal stem cell paracrine functions. *Stem Cells Transl. Med.* 2015;4(7):809–821.
24. Fuhrmann D.C., Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol.* 2017;12:208–215.
25. Presley A.D., Fuller K.M., Arriaga E.A. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003;793(1):141–150.
26. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., Mayol J.F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A*. 2011;79(6):405–425.
27. Ездакова М.И., Матвеева Д.К., Буравков С.В., Андреева Е.Р. Роль щелевых контактов во взаимодействии эндотелиальных и стромальных клеток. *Физиол. чел.* 2021;47(3):124–136.
28. Zhu Y. Gap junction-dependent and-independent functions of Connexin43 in biology. *Biology (Basel)*. 2022;11(2):283.
29. Zamorano M., Castillo R.L., Beltran J.F., Herrera L., Farias J.A., Antileo C., Aguilar-Gallardo C., Pessoa A., Calle Y., Farias J.G. Tackling ischemic reperfusion injury with the aid of stem cells and tissue engineering. *Front. Physiol.* 2021;12:705256.
30. Yang Y., Lee E.H., Yang Z. Hypoxia-conditioned mesenchymal stem cells in tissue regeneration application. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2022;28(5):966–977.
31. Blebea J., Vu J.H., Assadnia S., McLaughlin P.J., Atnip R.G., Zagon I.S. Differential effects of vascular growth factors on arterial and venous angiogenesis. *J. Vasc. Surg.* 2002;35(3):532–538.
32. Yu J., Wu J., Bagchi I.C., Bagchi M.K., Sidell N., Taylor R.N. Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011;344(1–2):25–34.
33. Suarez S., Ballmer-Hofer K. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2001;114(Part 6):1229–1235.
34. Muto T., Tien T., Kim D., Sarthy V.P., Roy S. High glucose alters Cx43 expression and gap junction intercellular communication in retinal Müller cells: promotes Müller cell and pericyte apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(7):4327–4337.
35. Duffy H.S., John G.R., Lee S.C., Brosnan C.F., Spray D.C. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1 β in primary human fetal astrocytes. *J. Neurosci.* 2000;20(23):RC114.

Поступила в редакцию 06.04.2023

После доработки 29.09.2023

Принята в печать 04.10.2023

RESEARCH ARTICLE

The sensitivity of multipotent mesenchymal stromal cells to short-term hypoxic stress *in vitro* depends on the efficiency of homotypic communication through gap junctions

M.I. Ezdakova , D.K. Matveeva , I.V. Andrianova , E.R. Andreeva* 

*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences,
76A Khoroshevskoye shosse, Moscow, 123007, Russia*

**e-mail: andreeva1564@gmail.com*

Gap junctions (GJ) provide metabolic cooperation between cells through the direct exchange of cytoplasmic components. We analyzed the effect of short-term hypoxic stress on the efficiency of communication through the GJs in cultured multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) and characterized the sensitivity of MSCs to short-term hypoxic stress depending on the GJ function. Mitotically inactive MSCs were used in the experiments, in which the GJs were blocked with a specific inhibitor – carbenoxolone. The MSCs were continuously cultured at 20% O₂. Further, MSCs with blocked and working GJs were subjected to hypoxic stress (0.1%, 24 hours). The efficiency of GJ communication was attenuated under hypoxic stress. The combined action of GJ inhibition and hypoxic stress was accompanied by an increase in ROS level as compared to the MSCs after hypoxic stress only. MSCs with blocked GJs were less sensitive to short-term hypoxic stress in comparison with MSCs integrated into the common network through working GJs. It was manifested in attenuation of hypoxia-induced angiogenic activity of MSCs. The angiogenic effects of conditioned medium from the MSCs with blocked GJs were almost twice less, which seems to be related to differences in the angiogenic mediators' profiles: VEGF level decreased and FGF-2 level increased, while the monocyte chemoattractant protein 3 (MCP-3) level was unchanged. Thus, a decrease in the efficiency of direct MSCs-MSCs communication had a negative effect on mostly requested MSCs activity – the ability to induce angiogenesis. We conclude that blocking of GJ communication in MSCs is a negative event that impairs the coordination of MSCs' response to the microenvironmental factors, in particular hypoxic stress, and reduces their functional plasticity.

Keywords: *multipotent mesenchymal stromal cells, homotypic gap junctions, inhibitor, short-term hypoxic stress, intracellular compartments, migration, soluble mediators, angiogenesis in ovo*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-015-00075.

Сведения об авторах

Ездакова Мария Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: ezdakova.mi@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9995-416X>

Матвеева Диана Константиновна — аспирантка, мл. науч. сотр. ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: matveeva.dajana@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1386-2836>

Андрианова Ирина Вячеславовна — канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: irandrianova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4986-0920>

Андреева Елена Ромуальдовна — докт. биол. наук., вед. науч. сотр. ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: andreeva1564@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1000-5804>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.24

Оценка состояния гематоретинального барьера при развитии признаков возрастной макулярной дегенерации у крыс OXYS

Д.В. Телегина , Д.А. Пеунов , Т.А. Козлова , Н.Г. Колосова* , О.С. Кожевникова

Лаборатория молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики,
Сибирское отделение Российской Академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 10
*e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — многофакторное нейродегенеративное заболевание, которое становится основной причиной необратимой потери зрения людьми старше 55 лет. Развитие влажной формы ВМД связывают с нарушением проницаемости гематоретинального барьера (ГРБ). Недавно было показано, что сухая форма ГРБ также сопровождается изменениями ГРБ, хотя ранее и считалось, что этого не происходит, однако информация о механизмах этих изменений на разных стадиях заболевания, тем более доклинических, ограничена. Целью настоящего исследования явилась оценка возможного вклада изменений проницаемости ГРБ в развитие признаков ВМД у крыс OXYS — модели сухой формы заболевания. В период, когда клинические признаки ВМД у крыс OXYS отсутствуют (возраст 20 сут), а также в периоды их манифестации (~5 мес.) и прогрессии (в 12 и 18 мес.) оценивали проницаемость ГРБ для красителя Эванса синего и содержание в сетчатке белков плотных контактов окклюдина, клаудина-5 и zonula occludens-1 (ZO-1). Контролем служили одновозрастные крысы Вистар. У крыс OXYS выявлено снижение проницаемости ГРБ, следствием которого может быть нарушение трофического обеспечения сетчатки, а также повышение уровня окклюдина в период прогрессии признаков ВМД. Уровень ZO-1 снижался с возрастом, но межлинейных различий не выявлено. Анализ транскриптомов сетчатки (данных RNA-seq) показал, что у крыс обеих линий изменения экспрессии генов, входящих (согласно Kyoto encyclopedia of genes and genomes — KEGG) в категорию плотных контактов, максимальны в период с возраста 20 сут до 3 мес. По сравнению с крысами Вистар у крыс OXYS в возрасте 3 мес. изменена экспрессия генов *Dlg1*, *Cd1d1*, *Map3k5* и *Arhgef2*, а в возрасте 18 мес. — *Crb3*, *F11r*, *Cgn*, *Cd1d1* и *Rap2c*. Такие изменения экспрессии генов в сетчатке крыс OXYS по мере развития признаков ВМД свидетельствуют об активации компенсаторных механизмов.

Ключевые слова: старение, сетчатка, гематоретинальный барьер, возрастная макулярная дегенерация, крысы OXYS

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-8

Введение

Как часть мозга, вынесенная на периферию, сетчатка является иммуно-привилегированным органом, обособленность которого обеспечивает гематоретинальный барьер (ГРБ), состоящий из внутреннего и внешнего барьеров. Внешний ГРБ образован плотными контактами между соседними клетками ретинального пигментного эпителия (РПЭ), капиллярами хориоидеи и мембраной Бруха [1]. Он регулирует процесс транспорта питательных веществ из крови в субретинальное пространство и удаления продуктов жизнедеятельности из него [2, 3]. Внутренний ГРБ образован плотными контактами эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки и обеспечивает высокоселективный транспорт молекул между кровью и тканями сетчатки. Согласованная работа

этих двух барьеров необходима для поддержания гомеостаза сетчатки [4], а нарушение их функций может приводить к накоплению переносимых кровью белков и других потенциально токсичных растворенных веществ в сетчатке [3].

Плотные контакты между клетками как внутреннего, так и внешнего ГРБ состоят из трансмембранных белков и белков периферических мембран, которые взаимодействуют друг с другом, образуя сложную сеть, и обеспечивают высокую степень селективности парацеллюлярной барьерной функции. Все плотные контакты имеют схожую структуру. Они состоят из MAL/MAL-подобных белков везикулярного транспорта и связи с мембраной, чаще всего окклюдина, соединительных молекул адгезии (junctional adhesion molecules — JAM) и белков

семейства клаудинов [5]. Селективность барьера определяется типом белка клаудина: в сетчатке для внешнего ГРБ характерен клаудин-19, а для внутреннего — клаудин-5. Плотные контакты связаны с цитоскелетом через адаптерные белки, такие как zonula occludens (ZO)-1, -2 и -3, которые играют важную роль в формировании и четкой организации плотных контактов [6].

Нарушение проницаемости ГРБ характерно для многих нейродегенеративных заболеваний сетчатки, в том числе — возрастной макулярной дегенерации (ВМД). ВМД — это сложное многофакторное заболевание, развивающееся в результате дисфункции комплекса «фоторецепторы—РПЭ—мембрана Бруха—хориокапилляры», которое становится основной причиной потери зрения людьми в возрасте старше 55 лет. Заболеваемость ВМД неуклонно растет на фоне увеличения продолжительности жизни населения планеты [7, 8]. Механизмы патогенеза ВМД до конца не раскрыты, но известно, что они существенно различаются при сухой (или атрофической, 10–20% случаев) и влажной (или экссудативной, ~90%) формах заболевания. При сухой ВМД образование друз и дисфункция РПЭ прогрессируют до географической атрофии — поздней стадии ВМД, характеризующейся потерей клеток РПЭ. Первичными причинами поражения при влажной форме ВМД являются нарушение микроциркуляции и потеря хориокапилляров. При этом происходит нарушение ГРБ, следствием которого становится скопление жидкости в субретинальном и/или интратретинальном пространстве, выявляемое методами клинической визуализации [7]. Напротив, принято считать, что ГРБ не страдает у пациентов с сухой формой ВМД. Однако недавно при исследовании посмертных образцов сетчатки людей с этой формой ВМД были выявлены признаки субклинической утечки ГРБ — повышенное количество сывороточных белков, включая компоненты иммунной системы [6]. Такие результаты свидетельствуют о том, что дисфункция ГРБ может способствовать развитию сухой формы ВМД, однако информация о его состоянии на разных стадиях заболевания, тем более доклинических, ограничена.

Этот вопрос мы исследовали на преждевременно стареющих крысах-альбиносах OXYS, у которых спонтанно развивается ретинопатия с основными признаками ВМД [9]. Такая ретинопатия соответствует преимущественно сухой атрофической форме заболевания. Тем не менее, с возрастом у части (~10–20%) крыс развиваются признаки влажной формы заболевания [9]. Первые клинические проявления ВМД-подобной ретинопатии у крыс OXYS — сочетание множественных мелких и немногочисленных средних друзоподобных отложений — развиваются к возрасту 3 мес. на фоне структурно-функциональных изменений РПЭ и нарушения хориоидальной ми-

кроциркуляции [10, 11]. С возрастом дегенеративные изменения сетчатки у крыс OXYS нарастают и сопровождаются избыточным накоплением липофусцина в РПЭ, нарушением морфологии его клеток, увеличением доли многоядерных клеток РПЭ, а также реактивным глиозом и выраженным истончением нейроретины к 18 мес. [12]. Целью настоящей работы стала оценка возможного вклада изменений ГРБ в развитие признаков ВМД у крыс OXYS. Для этого мы провели сравнение изменений с возрастом проницаемости ГРБ и уровня основных белков плотных контактов (окклюдина, клаудина-5 и ZO-1) в сетчатке крыс OXYS и Вистар (контроль).

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на одновозрастных крысах-самцах линий OXYS и Вистар (контрольная линия), содержащихся на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. С возраста 4 нед. животных содержали группами по пять особей в клетках размером 57 × 36 × 20 см при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ в условиях фиксированного режима освещения (10 ч свет (300–400 люкс) / 14 ч темнота (<0,1 люкс)), при свободном доступе к воде и пище — стандартному гранулированному корму для лабораторных животных (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия).

Метод Эванса. Для оценки проницаемости ГРБ 2%-ный раствор Эванса синего (ДИА-М. Россия, кат. № 23860) в физиологическом растворе (NaCl 0,9%) вводили животным (возраст 20 сут, 5, 12 и 18 мес., $n = 8$) внутрибрюшинно в дозировке 3 мл/кг. Через сутки после введения красителя животным вводили авертиновый наркоз в дозировке 2 мл/100 г веса, после чего проводили транскардиальную перфузию 100–120 мл фосфатного буферного раствора. Далее сетчатку извлекали и гомогенизировали в физиологическом растворе с добавлением 50% (масс.) трихлоруксусной кислоты в объемно-массовом соотношении 4:1 (раствор/ткань). Гомогенат центрифугировали при комнатной температуре при 10000 g. Для проведения флуориметрии в каждую лунку планшета наносили по 30 мкл супернатанта/калибровочного раствора и разводили 90 мкл 96%-ного этанола. Для построения калибровочной кривой использовали раствор Эванса синего в физиологическом растворе с добавлением 50% (масс.) трихлоруксусной кислоты. Флуориметрию производили при длинах волн поглощения/излучения — 620/680 нм на многофункциональном планшетном считывателе CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия). При проведении эксперимента за основу были взяты методики, описанные ранее [13, 16], и данные, полученные Вонг и Лай [17].

Вестерн-блот-анализ. Крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 сут, 5 и 18 мес. ($n = 6$) ингаляционно усыпляли углекислотой, декапитуировали и извлекали хориоретинальный комплекс. Белок выделяли с помощью буфера RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1%-ный Triton X100, 1%-ный дезоксихолат натрия, 0,1-ный додецилсульфат натрия (SDS), 1 mM EDTA) с добавлением смеси ингибиторов протеаз и фосфатаз (P8340, Sigma, США). После тщательного гомогенизирования раствор белка центрифугировали на при 12000 g (4°C) в течение 20 мин. Собирали супернатант и определяли концентрацию общего белка с помощью Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Образцы белка смешивали с 5-кратным буфером для загрузки (10%-ный SDS, 15%-ный меркаптоэтанол, 50%-ный глицерин, 0,3 M Tris-HCl, pH 6,8, бромфеноловый синий), инкубировали 10 мин при 95°C . Полученную смесь вносили в карманы геля в объеме, содержащем 30 мкг белка. Для электрофореза использовали 8%-ный SDS-полиакриламидный гель, помещенный в трис-глициновый буфер (25 mM Tris, 190 mM глицин, 0,1%-ный SDS). Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, Великобритания) осуществляли в камере для влажного переноса (Bio-Rad Laboratories, США) и затем полученную мембрану инкубировали в течение 1 ч в 5%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (SLBJ8588V, Sigma-Aldrich, США). Инкубацию с первичными антителами (концентрация 1:500) проводили при 4°C в течение ночи, а со вторичными антителами (концентрация 1:3000) — в течение часа при комнатной температуре. Затем обрабатывали мембрану реагентом для инициации люминесценции «Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate» (Thermo Fisher Scientific, США) и производили съемку на приборе ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, США). Для измерения уровня сигнала изображение анализировали в программе ImageJ (NIH, Bethesda, США). В работе использовались следующие первичные антитела: против клаудина-5 (AF5216, Affinity Biosciences, Китай), окклюдина (DF7504, Affinity Biosciences, Китай), ZO-1 (PAC262Ra01, Cloud-Clone Corp., Китай) и GAPDH (AF7021, Affinity Biosciences, Китай), а также соответствующие вторичные антитела (goat anti-rabbit, S0001, Affinity Biosciences, Китай).

Анализ данных транскриптома. Данные по уровню экспрессии генов в сетчатке крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 сут, 3 и 18 мес. ($n = 3$) были получены ранее методом секвенирования транскриптома (RNA-seq) на платформе Illumina [18, 19]. Статистический анализ дифференциальной экспрессии генов между линиями и возрастами проводили с помощью пакета DESeq2. Различия в уровнях экспрессии считали значимыми при $p_{\text{adj}} < 0,05$.

Для поправки на множественное сравнение использовался метод Бенжамини-Хохберга. Списки дифференциально экспрессирующихся генов сопоставлялись со списком генов, связанных с плотными контактами, базы данных KEGG pathway (<https://www.genome.jp/kegg/>) для отбора генов, включенных в регуляцию плотных контактов.

Статистический анализ. Статистические расчеты производили с помощью программного пакета Statistica 10.0 (Statsoft, США). Соответствие распределений условию нормальности проверяли в тесте Шапиро-Уилка, оценку однородности дисперсий проводили в тесте Левена. Для выявления выбросов был использован параметр Диксона, погрешности были исключены из анализа. Использовали факторный дисперсионный анализ ANOVA и непараметрический критерий Краскела — Уоллиса с апостериорным сравнением групповых средних. Следует отметить, что параметрические и непараметрические методы статистики приводили к аналогичным результатам. Как независимые факторы рассматривали генотип и возраст. Результаты анализа представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (Mean $\pm$ SD). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование проницаемости ГРБ с помощью красителя Эванса синего. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил влияние факторов «генотип» и «возраст» ($F_{1, 43} = 15,46$, $p < 0,001$; и $F_{3, 43} = 4,80$, $p < 0,01$) на проницаемость сетчатки для красителя Эванса синего: она снижалась к возрасту 18 мес. у крыс обеих линий, при этом у крыс OXYS была ниже, чем у крыс Вистар. Концентрация красителя Эванса синего в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар была значимо снижена в возрасте 20 сут ($59 \pm 34 \mu\text{M}$ против $103 \pm 32 \mu\text{M}$), 5 мес. ($64 \pm 22 \mu\text{M}$ против $99 \pm 20 \mu\text{M}$) и 18 мес. ($38 \pm 10 \mu\text{M}$ против $75 \pm 33 \mu\text{M}$), при этом не обнаружено межлинейных различий в 12 мес. ($93 \pm 42 \mu\text{M}$ против $109 \pm 32 \mu\text{M}$). Выявлено существенное снижение этого показателя у крыс OXYS — в 2,4 раза — с 12 до 18 мес. (рис. 1).

Изменение уровня белков плотных контактов клаудина-5, окклюдина и ZO-1 при старении и развитии ретинопатии. Далее был проведен анализ уровня белков плотных контактов клаудина-5, окклюдина и ZO-1 методом анализа Вестерн-блот (рис. 2). Согласно ANOVA, уровень клаудина-5 не зависел от возраста животных, но зависел от генотипа ($F_{1, 24} = 4,38$, $p < 0,05$) — и у крыс OXYS уровень этого белка был выше, чем у крыс Вистар. Однако сравнение групповых средних не выявило достоверных различий (рис. 2). Уровень окклюдина у крыс Вистар снижался с возрастом — выявлены значимые различия в его содержании в сетчатке 20-дневных и 18-месячных животных ($p < 0,05$).

У крыс OXYS уровень этого белка в сетчатке с возрастом не изменялся, но при этом в возрасте 18 мес. уровень окклюдина был у них значимо выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$) (рис. 2). Уровень белка ZO-1 зависел только от возраста животных ($F_{2,23} = 8,1471$, $p < 0,05$): наблюдалось значимое снижение этого параметра с возраста 20 сут до 5 мес. у крыс обеих линий, а с возраста 5 мес. до 18 мес. — только у крыс Вистар ($p < 0,05$). Различий между линиями обнаружено не было (рис. 2).

Исследование изменений транскриптома сетчатки крыс с возрастом и при развитии ретинопатии. Для оценки изменений экспрессии генов, связанных с плотными контактами, мы проанализировали транскриптомные данные (RNA-seq) сетчатки

20-суточных, 3- и 18-месячных крыс OXYS и Вистар [18, 19]. Из 170 генов, включенных, согласно базе данных KEGG pathway (rno04530, Tight junction), в категорию плотных контактов, у крыс OXYS в возрасте 20 сут была изменена, по сравнению с крысами Вистар, экспрессия 14 генов: уровень мРНК-генов *Lgl2*, *Stk11* и *Tjp2* повышен, а уровень генов *Mpp5*, *Ppp2r2b*, *Nedd4l*, *Rdx*, *Map3k5*, *Actr2*, *Actr3*, *Rock1*, *Prkaa2*, *Rap1a* и *Rap2c* снижен. В возрасте 3 мес. у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар экспрессия генов *Dlg1*, *Cd1d1* и *Map3k5* была снижена, а гена *Arhgef2* повышена. В возрасте 18 мес. был снижен уровень экспрессии *Crb3*, *F11r*, *Cgn*, *Cd1d1* и *Rap2c*. При этом экспрессия трех генов была снижена у крыс OXYS в двух возрастах: *Map3k5* —

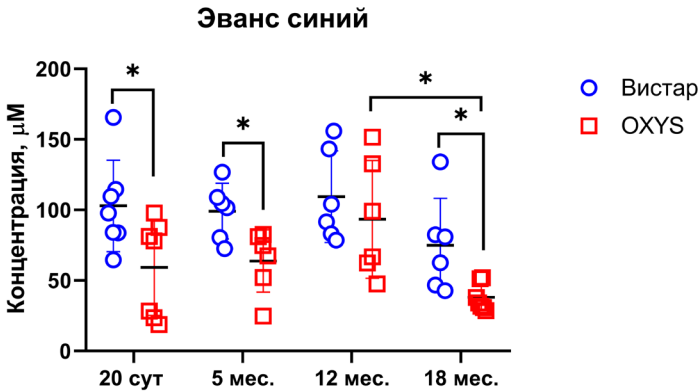


Рис. 1. Проницаемость сетчатки крыс Вистар и OXYS разного возраста для красителя Эванса синего. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. * — различия значимы, $p < 0,05$.

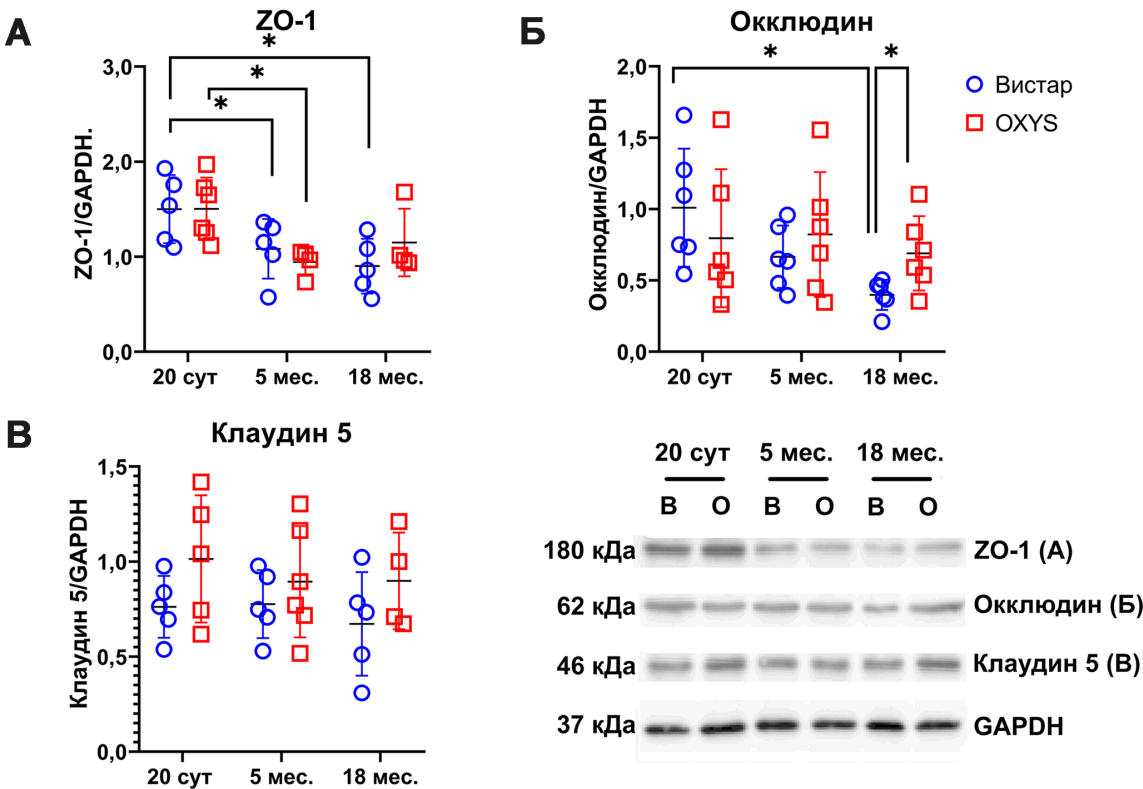


Рис. 2. Уровень белков плотных контактов клаудина-5, окклюдина и ZO-1 в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. * — различия значимы, $p < 0,05$. Условные обозначения: В — крысы Вистар, О — крысы OXYS.

в 20 сут и в 3 мес., *Cdld1* – в 3 мес. и в 18 мес., *Rap1a* – в 20 сут и в 18 мес. (рис. 3А).

С возраста 20 сут до 3 мес. в сетчатке крыс Вистар изменялась экспрессия 51 гена: уровень мРНК 26 из них снизился и 25 – вырос. С возраста 3 мес. до 18 мес. у крыс Вистар повышался уровень мРНК трех генов: *Actg1*, *Cgn* и *Cldn9* (рис. 3Б). При этом уровень мРНК гена *Cldn9* увеличивался у крыс Вистар с возраста 20 сут до 18 мес. У крыс OXYs с возраста 20 сут до 3 мес. изменялась экспрессия 60 генов (экспрессия 27 снижалась, а 33 – возрастала), а с возраста 3 мес. до 18 мес. только одного: повысился уровень мРНК гена *Dlg1*. Следует отметить, что экспрессия гена *Dlg1* у крыс OXYs неуклонно росла с возраста 20 сут до 18 мес. Таким образом, как у крыс Вистар, так и у крыс OXYs наиболее значительные изменения экспрессии генов, связанных с плотными контактами, происходили с возраста 20 сут до 3 мес., при этом изменения 35 генов были однонаправленными у крыс обеих линий, а изменения экспрессии 16 генов были характерны только для крыс Вистар и 25 – только для крыс OXYs (рис. 3В).

Обсуждение

Нарушение проницаемости ГРБ характерно для многих нейродегенеративных заболеваний сетчатки [20], и, как показано, первой нарушается целостность внешнего ГРБ, образованного клетками РПЭ, соединенными плотными контактами, и только потом – внутреннего [21]. Одним из кос-

венных признаков нарушения целостности внешнего ГРБ является потеря клетками РПЭ своей уникальной гексагональной морфологии, которая свидетельствует о необратимом эпителиально-мезенхимальном переходе и проявляется, в том числе, в увеличении доли многоядерных клеток и нарушении плотных контактов между ними [22]. Ранее в своих исследованиях мы показали, что у крыс OXYS описанные выше морфологические изменения клеток РПЭ детектируются уже в возрасте 20 сут, до появления клинических признаков ретинопатии [11]. По мере развития и прогрессии признаков ВМД нарушения гексагональной организации клеток и их контактов нарастают и приводят к образованию гигантских многоядерных клеток РПЭ без четкой морфологии и с большим количеством аутофлуоресцирующего содержимого [11]. При этом удельная плотность клеток РПЭ с возрастом снижается, а межлинейные различия по этому параметру отсутствуют, с чем согласуется характер изменений уровня ZO-1. В то же время ранее мы выявили ряд патологических нарушений цитоскелета в клетках РПЭ крыс OXYS на стадии активной прогрессии заболевания: фокальное расщепление, утолщение и истончение границ, округление формы клеток и фрагментацию цитоскелета [23]. Косвенно такие нарушения цитоскелета также указывают, в том числе, на изменения плотных контактов, и, как следствие, внешнего ГРБ [24, 25]. Проявлением нарушения внешнего ГРБ становятся изменения ультраструктуры мембраны Бруха.

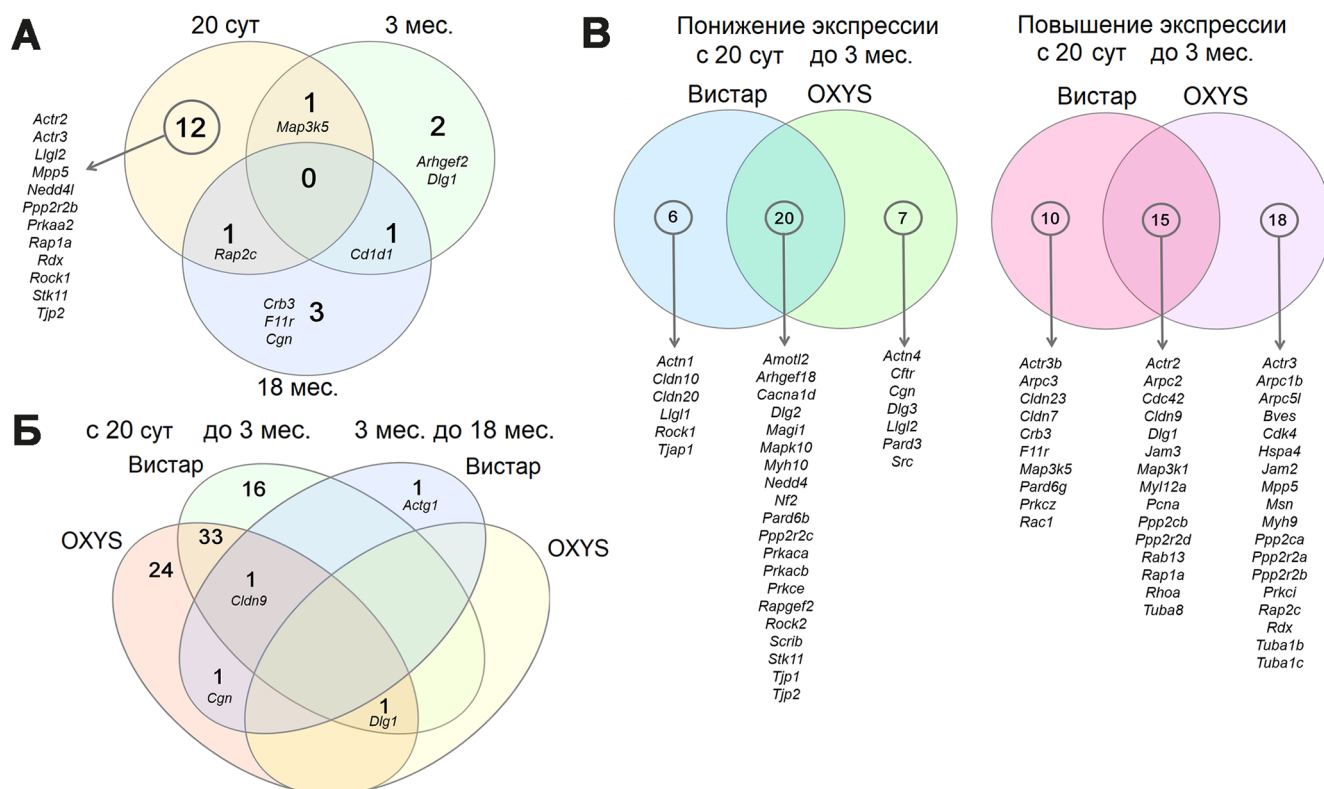


Рис. 3. Различия в экспрессии генов, связанных с плотными контактами, между крысами Вистар и ОХYS в возрасте 20 сут, 3 мес. и 18 мес. (А), а также изменения экспрессии с возраста 20 сут до 3 мес. и с 3 мес. до 18 мес. (Б, В).

которые нарастают у крыс OXYS по мере развития признаков ВМД [26].

Исследование проницаемости ГРБ с помощью введения красителя Эванса синего показало, что его проницаемость у крыс OXYS в возрасте 20 сут, 5 и 18 мес. ниже, чем у крыс Вистар. Считается, что краситель Эванс синий как *in vivo*, так и *in vitro* необратимо связывается с альбумином (69 кДа) в плазме крови в молярном соотношении 10:1 [27]. Транспорт альбумина через ГРБ может осуществляться как трансцеллюлярно через рецепторы, так и с помощью везикул. Важно отметить, что трансцеллюлярную проницаемость эндотелия сосудов сетчатки для многих молекул регулирует фактор роста сосудистого эпителия, повышение уровня которого приводит к активации везикулярного транспорта [4]. У крыс OXYS развитие ретинопатии происходит на фоне пониженного уровня данного фактора [28], что может вносить вклад в выявленное у них снижение проницаемости ГРБ. Можно полагать, что проницаемость ГРБ у крыс OXYS может быть снижена и для питательных веществ, что приводит к трофической недостаточности нейроретины, однако для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования. Согласно литературным данным, под нарушением гематоретинального и/или гематоэнцефалического барьеров при нейродегенеративных заболеваниях чаще всего понимают увеличение проницаемости этих барьеров [30, 31]. Однако очевидно, что как повышение, так и снижение проницаемости ГРБ может вносить вклад в развитие ВМД [2, 6].

Развитие ретинопатии у крыс OXYS характеризуется медленным, как и у людей с сухой формой ВМД, развитием патологии, и, соответственно, активацией компенсаторных механизмов. В пользу этого свидетельствуют результаты исследования уровня белков клаудина-5 и окклюдина в сетчатке крыс OXYS. Известно, что между содержанием белков плотных контактов — в частности, клаудина-5 — и проницаемостью ГРБ существует обратная зависимость, и его проницаемость динамически изменяется, в том числе под влиянием глиальных клеток сетчатки — клеток Мюллера [29, 30]. Клаудин-5 экспрессируется в основном в сосудах внутреннего ГРБ и отсутствует в клетках РПЭ. Тем не менее показано, что в местах атрофии клеток РПЭ отростки глии Мюллера создают уплотнение на мембране Бруха и индуцируют атипичную экспрессию клаудина-5, таким образом восстанавливая ГРБ [21, 31]. Ранее мы показали, что у крыс OXYS с возраста 7 мес. наблюдаются активация и реактивный глиоз клеток Мюллера и астроцитов [11], а в возрасте 3 мес. и 18 мес. у крыс OXYS, по сравнению с крысами Вистар, изменено большее количество генов, связанных с воспалением и иммунным ответом [18]. Таким образом, можно предположить, что отсутствие из-

менений уровня окклюдина и повышенный уровень клаудина-5 в сетчатке крыс OXYS, а также снижение ее проницаемости для Эванса синего на фоне сосудистых нарушений и атрофии клеток РПЭ [10, 28] может быть связано с активацией клеток Мюллера и запуском компенсаторных процессов. В пользу этого свидетельствуют также результаты исследования транскриптома: наиболее существенные различия (по сравнению с крысами Вистар) в экспрессии генов, связанных с плотными контактами, наблюдались у крыс OXYS в возрасте 20 сут — период завершения формирования сетчатки [19]. При этом изменения их экспрессии с возраста 20 сут до 3 мес. были сходными у крыс обеих линий, а на стадии манифестации и активной прогрессии признаков ВМД межлинейные различия были минимальными. Примечательно, что в сетчатке крыс OXYS по мере развития признаков ВМД увеличивалась экспрессия гена *Dlg1*, который активирует передачу сигналов бета-катенина — компонента сигнального пути Wnt — и таким образом участвует в регуляции ангиогенеза в сетчатке и проницаемости ГРБ [32]. Недавно было показано, что с мутацией в гене *DLG1* связано развитие семейной экссудативной витреоретинопатии — наследственного заболевания глаз, характеризующегося неполной/аномальной васкуляризацией периферической сетчатки, которая в конечном итоге приводит к полной слепоте [33].

Заключение

Механизмы инициации и прогрессирования ВМД, а также вклад в них структурно-функциональных нарушений ГРБ остаются недостаточно изученными из-за отсутствия адекватных моделей заболевания. В настоящем исследовании мы провели сравнение изменений с возрастом проницаемости ГРБ для красителя Эванса синего у крыс Вистар и крыс OXYS, у которых развивается ретинопатия, аналогичная сухой форме ВМД у людей. Выявлено снижение проницаемости ГРБ у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар на всех стадиях ретинопатии, следствием которого может быть нарушение трофики сетчатки. Анализ изменений экспрессии генов плотных контактов в сетчатке крыс OXYS по мере развития признаков ВМД может свидетельствовать об активации компенсаторных механизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №21-15-00047). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленных в Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета европейского союза от 22 сентября 2010 г., и одобрены Комиссией по биоэтике института цитологии и генетики Российской академии наук (Протокол №85/1 от 18.06.2021). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fields M.A., Del Priore L.V., Adelman R.A., Rizzolo L.J. Interactions of the choroid, Bruch's membrane, retinal pigment epithelium, and neurosensory retina collaborate to form the outer blood-retinal-barrier. *Prog. Retin. Eye Res.* 2020;76:100803.
2. Campbell M., Humphries P. The blood-retina barrier: tight junctions and barrier modulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;763:70–84.
3. Naylor A., Hopkins A., Hudson N., Campbell M. Tight junctions of the outer blood retina barrier. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;21(1):211.
4. Díaz-Coránguez M., Ramos C., Antonetti D.A. The inner blood-retinal barrier: cellular basis and development. *Vision Res.* 2017;139:123–137.
5. Vermette D., Hu P., Canarie M.F., Funaro M., Glover J., Pierce R.W. Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review. *Intensive Care Med. Exp.* 2018;6(1):37.
6. O'Leary F., Campbell M. The blood-retina barrier in health and disease. *FEBS J.* 2023;290(4):878–891.
7. Фурсова А.Ж., Дербенева А.С., Васильева М.А., Никулич И.Ф., Тарасов М.С., Гамза Ю.А., Чубарь Н.В., Гусаревич О.Г., Дмитриева Е.И., Кожевникова О.С., Колосова Н.Г., Елизарова А.А. Новые данные о патогенетических механизмах развития возрастной макулярной дегенерации. *Вестн. офтальмол.* 2022;138(2):120–130.
8. Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Derbeneva A.S., Nikulich I.F., Tarasov M.S., Devyatkin V.A., Rummyantseva Y.V., Telegina D.V., Kolosova N.G. Association between polymorphisms in CFH, ARMS2, CFI, and C3 Genes and response to anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Biomedicines.* 2022;10(7):1658.
9. Kozhevnikova O.S., Telegina D.V., Tyumentsev M.A., Kolosova N.G. Disruptions of Autophagy in the rat retina with age during the development of age-related-macular-degeneration-like Retinopathy. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(19):4804.
10. Kozhevnikova O.S., Telegina D.V., Devyatkin V.A., Kolosova N.G. Involvement of the autophagic pathway in the progression of AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Biogerontology.* 2018;19(3):223–235.
11. Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Bayborodin S.I., Kolosova N.G. Contributions of age-related alterations of the retinal pigment epithelium and of glia to the AMD-like pathology in OXYS rats. *Sci. Rep.* 2017;7(1):41533.
12. Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S., Muraleva N.A., Rudnitskaya E.A., Rummyantseva Y.V., Stefanova N.A., Telegina D.V., Tyumentsev M.A., Fursova A.Zh. SkQ1 as a Tool for controlling accelerated senescence program: experiments with OXYS rats. *Biochemistry (Mosc.).* 2022;87(12):1552–1562.
13. Kelley K.A. Transport of mouse lines by shipment of live embryos. *Methods enzymology. Guide to techniques in mouse development, part A: Mice, embryos, and cells, 2nd edition, vol. 476.* Eds. P.M. Wassarman and P.M. Soriano. Academic Press; 2010:25–36.
14. Goldim M.P. de S., Della Giustina A., Petronilho F. Using Evans blue dye to determine blood-brain barrier integrity in rodents. *Curr. Protoc. Immunol.* 2019;126(1):e83.
15. Kim Y., Lee S., Zhang H., Lee S., Kim H., Kim Y., Won M.H., Kim Y.M., Kwon Y.G. CLEC14A deficiency exacerbates neuronal loss by increasing blood-brain barrier permeability and inflammation. *J. Neuroinflammation.* 2020;17(1):48.
16. *Perfusion of Mouse – Bridges Lab Protocols* [Электронный ресурс]. URL: http://bridgeslab.sph.umich.edu/protocols/index.php?title=Perfusion_of_Mouse&mobileaction=toggle_view_mobile (дата обращения: 17.01.2023).
17. Wang H.L., Lai T.W. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci. Rep.* 2014;4(1):6588.
18. Kozhevnikova O.S., Korbolina E.E., Ershov N.I., Kolosova N.G. Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy. *Cell Cycle.* 2013;12(11):1745–1761.
19. Telegina D.V., Korbolina E.E., Ershov N.I., Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S. Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy. *Cell Cycle.* 2015;14(22):3544–3556.
20. Cunha-Vaz J. The blood-retinal barrier in the management of retinal disease: EURETINA award lecture. *Ophthalmologica.* 2017;237(1):1–10.
21. Ivanova E., Alam N.M., Prusky G.T., Sagdulaev B.T. Blood-retina barrier failure and vision loss in neuron-specific degeneration. *JCI Insight.* 2019;4(8):e126747.
22. Shu D.Y., Butcher E., Saint-Geniez M. EMT and EndMT: Emerging roles in age-related macular degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(12):4271.
23. Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Kolosova N.G. Autophagy as a target for the retinoprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1. *Biochemistry (Mosc.).* 2020;85(12):1640–1649.
24. Rizzolo L.J. Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 2007;258:195–234.
25. Rizzolo L.J., Peng S., Luo Y., Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 2011;30(5):296–323.
26. Markovets A.M., Saprunova V.B., Zhbankina A.A., Fursova A.Zh., Bakeeva L.E., Kolosova N.G. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Aging (Albany N.Y.).* 2010;3(1):44–54.
27. Xu Q., Qaum T., Adamis A.P. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001;42(3):789–794.
28. Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Markovets A.M., Telegina D.V., Muraleva N.A., Kolosova N.G. VEGF and PEDF levels in the rat retina: effects of aging and AMD-like retinopathy. *Adv. Gerontol.* 2018;31(3):339–344.
29. Barber A.J., Antonetti D.A., Gardner T.W. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41(11):3561–3568.
30. Liu X., Dreffs A., Díaz-Coránguez M., Runkle E.A., Gardner T.W., Chiodo V.A., Hauswirth W.W., Antonetti D.A. Occludin S490 phosphorylation regulates vascular endothelial growth factor-induced retinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2016;186(9):2486–2499.
31. Edwards M.M., McLeod D.S., Bhutto I.A., Grebe R., Duffy M., Luty G.A. Subretinal glial membranes in eyes with geographic atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017;58(3):1352–1367.

32. Cho C., Wang Y., Smallwood P. M., Williams J., Nathans J. Dlg1 activates beta-catenin signaling to regulate retinal angiogenesis and the blood-retina and blood-brain barriers. *eLife*. 2019;8:e45542.

33. Zhang S., Li X., Liu W., Zhang X., Huang L., Li S., Yang M., Zhao P., Yang J., Fei P., Zhu X., Yang Z. Whole-exome sequencing identified DLG1 as a candidate gene for

familial exudative vitreoretinopathy. *Genet. Test Mol. Biomarkers*. 2021;25(5):309–316.

Поступила в редакцию 24.06.2023

После доработки 25.10.2023

Принята в печать 30.10.2023

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the state of the blood-retinal barrier during the development of signs of age-related macular degeneration in OXYS rats

D.V. Telegina , D.A. Peunov , T.A. Kozlova , N.G. Kolosova* , O.S. Kozhevnikova 

Laboratory of Ageing Molecular Mechanisms Research, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 pr. Akademica Lavrentieva, Novosibirsk, 630090, Russia

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

Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial neurodegenerative disease that is becoming the leading cause of irreversible vision loss in people over 55 years of age. The development of the wet form of AMD is associated with impaired permeability of the blood-retinal barrier (BRB). It was believed that the BRB does not change in the dry form of the disease, but recently it was shown that dysfunction of the BRB may also contribute to its development; however, information about the state of the BRB at different stages of AMD, especially preclinical ones, is limited. The purpose of this study was to assess the possible contribution of changes in BRB permeability to the development of signs of AMD in OXYS rats, a model of the dry form of the disease. During the period when clinical signs of AMD in OXYS rats are absent (age 20 days), during their manifestation (~5 months) and progression (at 12 and 18 months), the permeability of the BRB for Evans blue dye and the retinal contents of the tight junction proteins occludin, claudin-5, and zonula occludens-1 (ZO-1) were assessed. Wistar rats of the same age served as controls. In OXYS rats, a decrease in the permeability of the BRB was detected, which may result in a violation of the trophic supply of the retina, as well as an increase in the level of occludin during the progression of signs of AMD. ZO-1 level decreased with age, but no interstrain differences were detected. Analysis of retinal transcriptomes (RNA-seq data) showed that in rats of both strains changes in the expression of genes included (according to KEGG) in the category of tight junctions are maximum in the period from 20 days to 3 months. In OXYS rats, the mRNA levels of the *Dlg1*, *Cd1d1*, *Map3k5* and *Arhgef2* genes at the age of 3 months and the *Crb3*, *F11r*, *Cgn*, *Cd1d1* and *Rap2c* genes the age of 18 months are different compared to Wistar rats. Such changes in gene expression in the retina of OXYS rats as AMD signs develop indicate the activation of compensatory mechanisms.

Keywords: aging, retina, blood-retinal barrier, age-related macular degeneration, OXYS rats

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 21-15-00047.

Сведения об авторах

Телегина Дарья Викторовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4128; e-mail: telegina@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8096-0519>

Пеунов Даниил Александрович — аспирант лаб. молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4128; e-mail: peunovda@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-0062-5537>

Козлова Татьяна Александровна — мл. науч. сотр. аспирант лаб. молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4129; e-mail: kozlova@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9922-7496>

Колосова Наталия Гориславовна — докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4109; e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2398-8544>

Кожевникова Оюна Суранзановна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4129; e-mail: oidopova@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6475-4061>

МНЕНИЕ



УДК 57.017.67+593.711+616-053.9+616-009.8+616.894-053.8+616.89-02-084

Почему у пресноводной гидры не бывает болезни Альцгеймера

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 рассматривается история исследования фундаментальных механизмов патогенеза болезни Альцгеймера (БА). Анализируются концепции, в которых решающая роль в развитии данной болезни приписывалась алюминию или свободным радикалам. Подчеркивается отсутствие на сегодняшний день надежных данных в поддержку этих концепций. Излагается точка зрения автора, согласно которой практически все результаты, свидетельствующие о целесообразности использования антиоксидантов (а также других потенциальных лекарств от БА) для предотвращения и лечения БА, были получены на модельных животных с теми или иными патологиями (например, с сильным окислительным стрессом), которые и способствуют формированию симптомов, сходных с симптомами БА у людей. В этой связи проводятся параллели с экспериментально-геронтологическими работами, направленными на изучение влияния калорийно ограниченного питания на старение и продолжительность жизни. Отмечается, что и в этих исследованиях использовали животных, которые либо не являлись совершенно нормальными, либо находились в неблагоприятных условиях. По мнению автора, отсутствие серьезных успехов в разработке эффективных геропротекторов или препаратов для профилактики/лечения БА связано с игнорированием большинством специалистов принципов классической геронтологии — в частности, определений старения и возрастных болезней, а также корректных подходов к выбору контрольных объектов для своих исследований. Подчеркивается, что человек, к сожалению, не может использовать для борьбы со старением и возрастными болезнями метод пресноводной гидры. Она в определенных условиях непрерывно обновляет все клетки (включая нервные) своего организма и тем самым обеспечивает свое «бессмертие». У человека замена «старых» нейронов может привести к утрате личности/индивидуальности, а «ремонт» этих клеток на сегодняшний день представляется невозможным. В связи с этим автор считает целесообразным проводить исследования старения постмитотических клеток в экспериментах на стационарных клеточных культурах, что может ускорить, в частности, расшифровку механизмов накопления в нейронах бета-амилоида и старческих пигментов типа липофусцина. Отмечается необходимость проведения клинических исследований БА как дополняющих экспериментальные работы, хотя первые и являются гораздо более дорогими и длительными. Только подтверждение в исследованиях на людях эффективности препаратов, разработанных в экспериментах на модельных животных, позволит рекомендовать их для использования в клинике.

Ключевые слова: *болезнь Альцгеймера, алюминий, свободные радикалы, старение, клеточная пролиферация, бета-амилоид, постмитотические клетки, нестареющие организмы, пресноводная гидра*

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

В конце 80-х гг. прошлого автор этой статьи — тогда еще совсем молодой ученый-геронтолог — сидел на московской международной конференции, посвященной нейробиологии старения, и слушал доклад коллеги из Канады, посвященный роли алюминия в патогенезе спорадической (возникающей в позднем возрасте в отсутствие очевидных генетических аномалий) болезни Альцгеймера (БА). Все присутствующие восприняли приведенные им факты как указание на то, что

именно алюминий, поступающий с водой и пищей, приводит к развитию этой болезни. Хотя докладчик, судя по всему, имел в виду не совсем такую интерпретацию приведенных им данных. Звали его Д.Р. Краппер Маклоклен (D.R. Crapper McLachlan), и он уже был хорошо известен среди специалистов своими публикациями на эту тему в серьезных научных журналах. Судя по всему, до 1980 г. он публиковался под фамилией Crapper, а потом взял себе двойную фамилию — Crapper

McLachlan. Это обстоятельство несколько усложняет поиск его статей, т.к. в Интернете (Google Scholar, PubMed и т. п.) можно обнаружить самые разные варианты (очень часто — ошибочные) написания его инициалов и фамилии. Однако поиск по ключевым словам (Crapper, aluminum, Alzheimer's disease, neurofibrillary degeneration) позволяет практически безошибочно вычислить соответствующие публикации этого ученого как до 1980 г., так и после [1–9]. Впрочем, 100%-ной уверенности в правильности поиска у меня все равно нет. Идеи Краппера Маклоклена были суммированы в 1986 г. (как раз перед его приездом в Москву с докладом) в развернутом обзоре, озаглавленном «Алюминий и болезнь Альцгеймера» [9]. В работе отмечалось, что алюминий, без сомнения, накапливается в сером веществе мозга при нейрофибриллярной дегенерации, ассоциированной с БА. При этом автор выделил четыре основных объекта, связанные с накоплением алюминия: ДНК-содержащие участки ядра мозга, белковые фрагменты нейрофибриллярных клубков, амилоидные ядра сенильных бляшек и церебральный ферритин. С одной стороны, предполагалось, что токсические эффекты алюминия в этих объектах наверняка связаны с патогенезом наблюдаемой нейродегенерации. С другой стороны, автор отмечал, что имеющиеся данные не позволяют с уверенностью судить об этиологической роли алюминия в развитии БА. Краппер Маклоклен в своем обзоре сформулировал идею о том, что «первичные патогенетические процессы», ответственные за возникновение и развитие БА, нарушают, по-видимому, генетически запрограммированные барьеры для алюминия, что и приводит к увеличению его содержания в перечисленных «критических» участках.

Однако результаты работ Краппера Маклоклена и его коллег были подвергнуты серьезной критике. При этом авторы критических публикаций восприняли идеи Краппера Маклоклена именно как признание ведущей роли алюминия в этиологии и патогенезе БА. В частности, сразу после упомянутого выше обзора 1986 г. в том же выпуске журнала был напечатан комментарий Висневского с соавт. [10], в котором подчеркивается, что Краппер Маклоклен однобоко рассмотрел данные об алюминии и БА, не вникая в детали биологии этой болезни, а также патологических и биохимических ее проявлений. По мнению авторов данного комментария, на момент публикации не было никаких доказательств участия алюминия в формировании патологических признаков и симптомов БА. Они подчеркнули, что, судя по всему, главной причиной когнитивных нарушений при БА являются возникающие проблемы с функционированием холинергической системы. Странно, что при этом авторы проигнорировали вывод Краппера Маклоклена о «вторичности» накопления алюминия в мозге.

Впрочем, Краппер Маклоклен не сдался и опубликовал в последующие годы еще несколько работ, в которых подчеркивалась теперь уже «активная роль» алюминия в патогенезе БА. В частности, одна из них [11] так и называлась — «New evidence for an active role of aluminum in Alzheimer's disease». В ней отмечалось, что использование современных молекулярно-биологических подходов позволило авторам подтвердить, что алюминий действительно является важным фактором в даун-регуляции белкового метаболизма в нейронах. Авторы предположили, что при БА алюминий действует как агент, обеспечивающий «электростатическое поперечное связывание» ДНК, а также белков (в частности, метионин-содержащего гистона H1^o). Образующиеся поперечные сшивки подавляют транскрипцию по крайней мере одного конкретного гена нейронов, ответственного за синтез низкомолекулярного фрагмента нейрофиламентов. В верхней височной извилине при БА даун-регуляция этого гена происходит примерно у 86% выживших нейронов, и, следовательно, алюминий должен рассматриваться как играющий активную роль в патогенезе. Авторы проанализировали эпидемиологические исследования, которые, по их мнению, независимо подтверждали гипотезу о том, что алюминий в окружающей среде является значительным фактором риска. По их мнению, предварительные данные также свидетельствовали о том, что нарушение фосфорилирования может быть важным иницирующим фактором процесса.

Впрочем, интерес к алюминию в связи с БА не утих. Исследования продолжаются, но определенных выводов так и нет, хотя большинство авторов склоняется все-таки к выводу, что не существует реальных доказательств гипотезы, согласно которой патогенез БА запускается алюминием, получаемым с пищей и водой — по крайней мере, в дозах, в которых его потребляют жители Северной Америки и Западной Европы (см., например, обзор Уилхайта с сотр. [12]).

В 1991 г. автор этой статьи на конференции по старению, организованной в Денвере известным геронтологом Денхамом Харманом (Denham Harman), позволил себе задать коллегам вопрос, как они относятся к идее о роли алюминия в возникновении БА. Вопрос был встречен со смехом, т.к. все присутствующие были абсолютно уверены, что в основе патогенеза этой болезни лежат образующиеся в организме свободные радикалы. И эта идея до сих пор очень популярна, статей на данную тему публикуется очень много (например, [13–18]), да и в соцсетях эти работы набирают очень большое количество просмотров и «лайков» (см., например, фантастически высокие альтметрики у статьи Хуанга с соавт. [15] на сайте издательства Spandidos Publications).

Казалось бы, признание ведущей роли свободных радикалов в этиологии и патогенезе БА

должно было автоматически означать, что бороться с этим заболеванием нужно с помощью антиоксидантов. И таких попыток было предпринято огромное количество. С одним «но». На сайте организации Alzheimer's Society в разделе «Антиоксиданты и деменция» написано, что хотя лабораторные испытания на животных перспективных в этом плане препаратов давали обнадеживающие результаты, на сегодняшний день, к сожалению, не существует надежных данных о возможности использования антиоксидантов для предотвращения или лечения БА у людей.

Во всех упомянутых выше лабораторных экспериментах ученые использовали животных с так называемой «модельной» БА, симптомы которой в первом приближении соответствовали симптомам «настоящей» БА. Действительно, в таких работах были получены очень интересные данные о роли окислительного стресса в развитии патологических процессов в головном мозге, но, на наш взгляд, они не никак не продвинули человечество в понимании того, как возникает БА и каким образом ее можно было бы лечить. Видимо, этот вывод касается большей части работ, посвященных попыткам повлиять на БА.

Значительное количество исследований такого плана были проведены Н.Г. Колосовой и ее коллегами на крысах OXYS с рано развивающимся окислительным стрессом. В частности, они продемонстрировали [19, 20], что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 снижает у этих животных выраженность развития симптомов, сходных с симптомами БА у людей. И похожие работы, обосновывающие целесообразность исследований БА на разных модельных животных, появляются с завидной регулярностью (см., например, [21–23]).

Очевидно, что модельные объекты – особенно в геронтологических исследованиях – необходимы. Они позволяют сильно сократить финансовые затраты и, что самое важное, время, необходимое для получения каких-либо значимых результатов. Проведение фундаментальных лонгитудинальных исследований на людях может потребовать нескольких десятков лет, а на модельных животных их можно провести в 10–15 раз быстрее. Однако при этом возникает проблема корректного подбора таких объектов, о чем мы с коллегами уже писали ранее [24].

Это положение можно проиллюстрировать на примере геронтологических исследований ограничения калорийности питания – по-видимому, наиболее известного (и, возможно, единственного подтвержденного на сегодняшний день) геронпротекторного воздействия [25]. Эти исследования были инициированы выполненной в 1935 г. пионерской работой Клайва Маккея (Clive McCay) с коллегами [26].

В экспериментах на крысах линии Фишер-344 Маккей обнаружил, что уменьшение калорийности потребляемой пищи (за счет снижения количества жиров и углеводов, но не белков) при сохранении полноценности ее состава приводит не только к замедлению роста, но и к значительному увеличению как средней, так и максимальной продолжительности жизни животных [26]. Сходные эксперименты многократно проводились впоследствии в различных геронтологических лабораториях на разных объектах, а также в рамках клинических исследований, однако далеко не всегда результаты были такими же обнадеживающими. В связи с этим надо подчеркнуть, что, ссылаясь на работы Маккея, ученые часто игнорируют три важных обстоятельства:

1) Крысы Фишер-344 являются короткоживущими. Насколько нам известно, их продолжительность жизни не превышает 1192 сут [27]. В дикой природе крысы могут жить четыре года и более [28] (хотя, конечно, вероятность дожить до такого возраста достаточно мала). Таким образом, даже с учетом значительного увеличения в опытах Маккея максимальной продолжительности жизни животных (вплоть до 1421 сут), она не достигала значений этого показателя для крыс дикого типа или даже некоторых долгоживущих чистых линий (например, Вистар [29]).

2) У крыс Фишер-344 высока частота развития спонтанных опухолей [30], так что ограничение питания могло влиять не столько на сам процесс старения, сколько на канцерогенез. Собственно, это отмечал и сам Маккей в своих последующих публикациях (см., например, работу, опубликованную им с коллегами в 1956 г. [31]).

3) Контрольные животные в экспериментах Маккея питались *ad libitum*, что, по-видимому, не является для них нормой. Иначе говоря, не исключено, что они просто слишком много ели и поэтому старели быстрее, а вот опытные крысы как раз питались «нормально».

Таким образом, складывается впечатление, что результаты исследований Маккея могли определяться не воздействием на фундаментальные механизмы старения, а лишь «удачным» выбором как контрольных животных, так и условий (не совсем благоприятных) их содержания. К сожалению, в последние десятилетия такой подход стал чрезвычайно популярным среди ученых-геронтологов, занимающихся поиском потенциальных геронпротекторов, а также лекарств против возрастных болезней.

Сходные соображения возникают у нас и при анализе широко известных экспериментально-геронтологических работ, выполненных на мышах SAM (senescence-accelerated mouse), крысах OXYS и так называемых «шведских» мышах с дефектной митохондриальной ДНК-полимеразой. Подробно эти вопросы были рассмотрены нами ранее [24].

Интересно, что в экспериментах В.Н. Анисимова с соавт. [32] на мышах нескольких линий было обнаружено, что антиоксидант SkQ1 проявляет свое геропротекторное действие только при содержании животных в не очень благоприятных условиях — в виварии, недостаточно хорошо защищенном от инфекционных агентов. При содержании мышей в другом, полностью защищенном от инфекций, виварии геропротекторный эффект SkQ1 исчезал.

Можно полагать, что во всех применяемых для изучения старения и возрастных болезней (в том числе — БА) модельных системах геропротекторное действие изучаемых соединений может определяться лишь тем, что использованные животные не являются «практически здоровыми» либо содержатся в неблагоприятных условиях. Помимо этого, у них у всех наблюдаются проявления окислительного стресса, связанного с усиленным образованием свободных радикалов, а изучаемые потенциальные геропротекторы, как правило, обладают антиоксидантными свойствами. В то же время существует точка зрения, согласно которой антиоксиданты проявляют свое геропротекторное действие как раз тогда, когда в экспериментах используются животные с различными патологиями (например, с высокой частотой спонтанных опухолей) или находящиеся в плохих условиях [33].

По-видимому, имеет смысл при проведении экспериментально-геронтологических исследований потенциальных геропротекторов усилить акцент на оценке продолжительности жизни (причем максимальной/видовой, а не средней, изменение которой может быть никак не связано с влиянием на процесс старения) нормальных высших животных и людей, находящихся в нормальных условиях, иначе мы будем относить к этому классу соединений все, что обеспечивает существование организма, в том числе — воду, пищу, витамины, микроэлементы и т.п. [34, 35]. Можно полагать, что этот вывод относится и к поиску средств борьбы с БА.

Еще одна известная история [36] касается исследований возможности применения для лечения/предотвращения БА известного онкологического препарата бексаротена. В 2012 г. в престижном журнале *Science* появилась публикация [37], посвященная изучению влияния этого препарата на мышей с модельной БА. Авторы обнаружили, что под влиянием бексаротена количество бета-амилоида в мозгу мышей уменьшается и это сопровождается улучшением памяти и когнитивных способностей животных. В результате был сделан вывод, что бексаротен должен быть очень эффективен в лечении болезни Альцгеймера у людей. Лично у меня использованная модельная система вызвала определенные сомнения (к сожалению, как уже отмечалось выше, очень часто перенесе-

ние на людей данных, полученных в экспериментально-геронтологических исследованиях на животных, является довольно проблематичным), и я написал коллегам, попытавшись узнать, что они думают о клинических испытаниях препарата. Мне сообщили, что такие испытания уже начинаются, ибо препарат давно утвержден Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (Food and Drug Administration, FDA) и с изучением его действия на болезнь Альцгеймера в клинике не будет этических проблем, а в его эффективности авторы не сомневаются. К сожалению, из этого у них ничего не получилось. В последующие годы появилось большое количество публикаций (см., например, [38–40]), опровергнувших идею авторов о возможности лечения бексаротеном БА у людей. Более того, даже результаты опытов на модельных животных не были подтверждены. Так печально закончилась история, которую в своих многочисленных докладах на симпозиумах по старению и БА я назвал «сагой о бексаротене и болезни Альцгеймера».

Складывается впечатление, что результаты экспериментов на модельных животных подтверждают вывод «удобно» — это не всегда «хорошо». А также — что многократно цитируемые публикации в «крутых» высокорейтинговых журналах не всегда обеспечивают нас корректными результатами [41]. Впрочем, «надежда всегда умирает последней». Работы, в которых с оптимизмом смотрели на перспективы использования бексаротена для лечения БА у людей, продолжали появляться (см., например, статью Г. Аикарди [42]) даже после опубликования опровержений данных экспериментов на модельных животных.

Если зайти на страницу «Болезнь Альцгеймера» в Википедии, то в глаза сразу бросается три вывода: 1) в настоящее время нет понимания причин и хода БА; 2) на данный момент не существует лекарств для предотвращения и лечения этой болезни; 3) какие-то положительные результаты в этой области были получены только на модельных животных.

По-видимому, развитие БА все-таки определяется не столько временем существования организма, сколько его старением, так как частота этого заболевания, за редкими исключениями, растет с возрастом экспоненциально (параллельно смертности) — так же, как растет частота онкологических или сердечно-сосудистых заболеваний, являющихся классическими примерами возрастных болезней. Поэтому исследователи, изучающие этиологию и патогенез БА, а также возможные способы ее предотвращения и лечения, должны обязательно учитывать положения «классической» геронтологии и, в частности, придерживаться «правильного» определения старения как совокупности возрастных изменений организма, ведущих к увеличению вероятности его смер-

ти [36, 43–45]. И конечно, важно соблюдение уже давно разработанных правил «корректного» проведения геронтологических исследований [46, 47].

Хотелось бы также заметить, что совсем не обязательно знать механизмы возникновения и течения болезни, чтобы научиться ее лечить. Нужно только грамотно спланировать эксперименты и правильно проанализировать полученные результаты, в том числе – корректными статистическими методами [48]. Об этом, в частности, свидетельствует история с изобретением в конце XVIII в. Эдвардом Дженнером вакцинации против оспы [48, 49]. Правда, Дженнеру не нужно было соблюдать требования комитетов по этике, которые в настоящее время вряд ли позволили ему экспериментировать на маленьком мальчике и его матери.

По-видимому, без длительных клинических исследований потенциальных средств борьбы с БА нам не обойтись, но проводить их, конечно, гораздо труднее, дороже и дольше, чем экспериментировать на модельных животных. Впрочем, если планируется не предотвращать болезнь, а лечить ее, то исследования могут быть значительно более короткими. Только что-то никому пока такие вещи не удаются. Если набрать в Google Scholar слова «cerebrolysin Alzheimer's», можно получить несколько тысяч ссылок на статьи, посвященные различным подходам к воздействию на БА церебролизин. К сожалению, ни нам, ни кому-либо из наших коллег не известны случаи излечения от БА с помощью данного препарата.

Как ни печально, данный вывод относится и к таким препаратам, официально одобренным FDA, как, например, адуканумаб или мемантин. На сегодняшний день так и нет доказательств их эффективности в лечении БА у людей.

Но что же все-таки с пресноводной гидрой (в названии статьи было «повешено на стенку ружье»)? Ситуация с этим нестареющим организмом уже была нами подробно рассмотрена ранее [50]. У гидры в оптимальных условиях существования все клетки, включая нервные, обновляются, так что ее организм непрерывно сбрасывает все «потенциально сенильные» клетки, слущивающиеся либо с аборальной поры, либо с концов щупалец. Возможно, поэтому у нее никогда не накапливаются старческие пигменты или бета-амилоид и не возникает даже модельной БА. И, по-видимому, никогда не болит голова, как мы отметили в одном из наших недавних докладов на геронтологической конференции. К сожалению, люди в принципе не могут использовать этот подход для борьбы со старением и БА. Не стареют те организмы, которым не важна личность/индивидуальность, обеспечиваемая с помощью постмитотических нейронов. А людям (как правило :)), важна. Так что, по-видимому, ни старения, ни болезни Альцгеймера нам не избежать. Если мы, конечно,

не изобретем все-таки какой-то способ либо избавления от «портящихся» нейронов (а также кардиомиоцитов и других постмитотических и очень медленно размножающихся клеток типа гепатоцитов), либо их «ремонта». К сожалению, на сегодняшний день эта задача представляется нам очень трудноразрешимой.

Заключение

БА в настоящее время является одним из основных нейропатологических заболеваний, уносящим огромное количество человеческих жизней и налагающим на наше общество огромный груз как в финансовом, так и в морально-психологическом плане. Для изучения БА часто используются модельные животные (мыши, крысы и др.), причем правомочность таких исследований вполне обоснованно вызывает определенные опасения, о чем я уже неоднократно писал [36]. В частности, это касается исследований возможности использования онкологического препарата бексаротена для лечения БА. Полученные результаты впоследствии были неоднократно опровергнуты. Впрочем, такие опасения вызывают почти все экспериментально-геронтологические исследования, выбор контрольных животных для которых довольно часто делается не совсем корректно [24, 36]. Если мы берем в качестве контроля животных с различными патологиями, то в большинстве случаев изучаемые препараты действуют не на сам процесс старения, а на эти конкретные нарушения у модельных объектов. В том числе, это касается успешного применения антиоксидантов для замедления старения животных с окислительным стрессом. Надо полагать, что любые результаты, касающиеся возможных подходов к профилактике или лечению БА и полученные на модельных животных, нуждаются в обязательной верификации в соответствующих клинических исследованиях. К сожалению, такие исследования сопряжены с огромными затратами денег и труда и, кроме того, во многих случаях требуют очень длительного времени, сопоставимого со временем жизни проводящих их ученых. Так что без экспериментов на модельных объектах нам в принципе не обойтись. Существует мнение, согласно которому возникновение многих (если не всех) нейропатологических заболеваний связано с наличием в организме высших животных, включая человека, нейронов, являющихся постмитотическими клетками, не способными к делению [25]. Можно полагать, что исследования роли ограничения клеточной пролиферации в формировании «сенильной» нейропатологии (в том числе и БА) можно было бы интенсифицировать либо с помощью экспериментов на «стационарно стареющих» клеточных культурах, клетки которых претерпевают «возрастные» изменения после достижения насыщающей плотности и остановки пролиферации

из-за контактного торможения [51, 52], либо на «бессмертных» организмах, полностью лишенных постмитотических клеток. Скажем, на пресноводной гидре [50], у которой в оптимальных условиях существования все клетки, включая нервные, обновляются, так что ее организм непрерывно сбрасывает все «потенциально сенильные» клетки. Повторюсь — не исключено, что именно из-за этого у нее никогда не накапливаются бета-ами-

лоид и старческие пигменты типа липофусцина, а также не возникает даже модельной БА.

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. Crapper D.R., Dalton A.J. Alterations and short-term retention, conditioned avoidance response acquisition and motivation following aluminum induced neurofibrillary degeneration. *Physiol. Behav.* 1973;10(5):925–933.
2. Crapper D.R., Krishnan S.S., Dalton A.J. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science.* 1973;180(4085):511–513.
3. Crapper D.R., Krishnan S.S., Quittkat S. Aluminum, neurofibrillary degeneration and Alzheimer's disease. *Brain.* 1976;99(1):67–80.
4. Crapper D.R., Quittkat S., De Boni U. Altered chromatin conformation in Alzheimer's disease. *Brain.* 1979;102(3):483–495.
5. Crapper D.R., Quittkat S., Krishnan S.S., Dalton A.J., De Boni U. Intracellular aluminum content in Alzheimer's disease, dialysis encephalopathy and experimental aluminum encephalopathy. *Acta Neuropathol. (Berl).* 1980;50(1):19–24.
6. De Boni U., Crapper McLachlan D.R. Senile dementia and Alzheimer's disease: A current view. *Life Sci.* 1980;27(1):1–14.
7. Crapper McLachlan D.R., Krishnan S.S., Quittkat S., De Boni U. Brain aluminum in Alzheimer's disease: influence of sample size and case selection. *NeuroToxicology.* 1980;1(4):25–32.
8. Crapper McLachlan D.R., Lewis P.N., Lukiw W.J., Senia A., Bergeron C., De Boni U. Chromatin structure in dementia. *Ann. Neurol.* 1984;15(4):329–334.
9. McLachlan D.R.C. Aluminum and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 1986;7(6):525–532.
10. Wisniewski H.M., Moretz R.C., Iqbal K. No evidence for aluminum in etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 1986;7(6):532–535.
11. McLachlan D.C., Lukiw W.J., Kruck T.P.A. New evidence for an active role of aluminum in Alzheimer's disease. *Canad. J. Neurol. Sci.* 1989;16(S4):490–497.
12. Willhite C.C., Ball G.L., McLellan C.J. Total allowable concentrations of monomeric inorganic aluminum and hydrated aluminum silicates in drinking water. *Crit. Rev. Toxicol.* 2012;42(5):358–442.
13. Tuppo E.E., Forman L.J. Free radical oxidative damage and Alzheimer's disease. *J. Osteopath. Med.* 2001;101(s121):11–15.
14. Retz W., Gsell W., Münch G., Rösler M., Riederer P. Free radicals in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease—From Basic Research to Clinical Applications.* Ed. H.J. Hertz and Th. Arendt. Wien: Springer-Verlag; 1998:221–236.
15. Huang W.J., Zhang X.I.A., Chen W.W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed. Rep.* 2016;4(5):519–522.
16. Peña-Bautista C., Baquero M., Vento M., Cháfer-Pericás C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clin. Chim. Acta.* 2019;491:85–90.
17. Ionescu-Tucker A., Cotman C.W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 2021;107:86–95.
18. Sharma C., Kim S., Nam Y., Jung U.J., Kim S.R. Mitochondrial dysfunction as a driver of cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(9):4850.
19. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1. *J. Alzheimer's Dis.* 2014;38(3):681–694.
20. Kolosova N.G., Tyumentsev M.A., Muraleva N.A., Kiseleva E., Vitovtov A.O., Stefanova N.A. Antioxidant SkQ1 alleviates signs of Alzheimer's disease-like pathology in old OXYS rats by reversing mitochondrial deterioration. *Curr. Alzheimer Res.* 2017;14(12):1283–1292.
21. Chin J. Selecting a mouse model of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. Methods in Molecular Biology, vol. 670.* Ed. E. Roberson. Totowa: Humana Press; 2010:169–189.
22. Hassanzadeh G., Hosseini A., Pasbakhsh P., Akbari M., Ghaffarpour M., Takzare N., Zahmatkesh M. Trimetazidine prevents oxidative changes induced in a rat model of sporadic type of Alzheimer's disease. *Acta Med. Iran.* 2015;53(1):17–24.
23. Saleem S., Kannan R.R. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell Death Discov.* 2018;4(1):45.
24. 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.
25. 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.
26. McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* 1935;10(1):63–79.
27. Chesky J.A., Rockstein M. Life span characteristics in the male Fischer rat. *Exp. Aging Res.* 1976;2(5):399–407.
28. Carey J.R., Judge D.S. *Longevity records: life spans of mammals, birds, amphibians, reptiles, and fish. Odense monographs on population aging, 8.* Odense: Odense Univ. Press; 2000. 241 pp.
29. Nistiar F., Raczy O., Lukacinova A., Hubkova B., Novakova J., Lovasova E., Sedlakova E. Age dependency on

some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 2012;47(9):1224–1233.

30. Maronpot R.R., Nyska A., Foreman J.E., Ramot Y. The legacy of the F344 rat as a cancer bioassay model (a retrospective summary of three common F344 rat neoplasms). *Crit. Rev. Toxicol.* 2016;46(8):641–675.

31. McCay C.M., Pope F., Lunsford W. Experimental prolongation of the life span. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 1956;32(2):91–101.

32. Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S., et al. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany N.Y.)*. 2011;3(11):1110–1119.

33. Frolkis V.V., Muradian Kh.K. *Life span prolongation*. Boca Raton: CRC Press; 1991. 427 pp.

34. 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*. Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry; 2017:53–74.

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

36. 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):239–243.

37. Cramer P.E., Cirrito J.R., Wesson D.W., Lee C.D., Karlo J.C., Zinn A.E., Casali B.T., Restivo J.L., Goebel W.D., James M.J., Brunden K.R. ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*. 2012;335(6075):1503–1506.

38. Balducci C., Paladini A., Micotti E., Tolomeo D., La Vitola P., Grigoli E., Richardson J.C., Forloni G. The continuing failure of bexarotene in Alzheimer's disease mice. *J. Alzheimer's Dis.* 2015;46(2):471–482.

39. O'Hare E., Jeggo R., Kim E.M., Barbour B., Walczak J.S., Palmer P., Lyons T., Page D., Hanna D., Meara J.R., Spanwick D. Lack of support for bexarotene as a treatment for Alzheimer's disease. *Neuropharmacol.* 2016;100:124–130.

40. Vidal V., Puente A., García-Cerro S., García Unzueta M.T., Rueda N., Riancho J., Martínez-Cué C.

Bexarotene impairs cognition and produces hypothyroidism in a mouse model of Down syndrome and Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 2021;12:613211.

41. Khokhlov A.N. How scientometrics became the most important science for researchers of all specialties. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020;75(4):159–163.

42. Aicardi G. New hope from an old drug: fighting Alzheimer's disease with the cancer drug bexarotene (targretin)? *Rejuvenation Res.* 2013;16(6):524–528.

43. Khokhlov A.N. The immortality of the germ line: the neverending story. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019;74(4):189–193.

44. 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.

45. 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.

46. Khokhlov A.N. On the cholesterol theory of aging—2022. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(4):292–296.

47. Khokhlov A.N. Basics of biology of aging for MSU non-biologists. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023;78(2):115–120.

48. 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.

49. Jenner E. *An inquiry into the causes and effects of variolae vaccinae, a disease discovered in some western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox*. London: Sampson Low; 1798. 75 pp.

50. Khokhlov A.N. On the immortal hydra. Again. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014;69(4):153–157.

51. 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.

52. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochastics? *Biogerontology*. 2013;14(6):703–708.

Поступила в редакцию 03.07.2023

После доработки 04.09.2023

Принята в печать 15.09.2023

OPINION ARTICLE

Why freshwater hydra does not get Alzheimer's disease

A.N. Khokhlov 

*Evolutionary Cyto gerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

The history of research into the basic mechanisms of the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) is briefly considered. Concepts are analyzed in which a decisive role in the development of this disease was attributed to aluminum or free radicals. The lack of reliable data to date to support these concepts is emphasized. The point of view of the author is presented, according to which almost all the results indicating the feasibility of using antioxidants (as well as other potential drugs for AD) for the prevention and treatment of AD were obtained on model animals

with certain pathologies (for example, with severe oxidative stress), which contribute to the formation of symptoms similar to those of AD in humans. In this regard, parallels are drawn with experimental gerontological research aimed at studying the effect of a calorie-restricted diet on aging and life span. It is noted that in these studies, animals were used that were either not completely normal or were in unfavorable conditions. According to the author, the lack of significant progress in the development of effective geroprotectors or drugs for the prevention/treatment of AD is due to the fact that most specialists ignore the principles of classical gerontology, in particular, the definitions of aging and age-related diseases, as well as the correct approaches to the selection of control objects for their studies. It is emphasized that humans, unfortunately, cannot use the freshwater hydra method to combat aging and age-related diseases. Under certain conditions, it continuously renews all cells (including nerve ones) of its body and thereby ensures its “immortality.” In humans, the replacement of “old” neurons can lead to the loss of personality/individuality, and the “repair” of these cells today seems impossible. In this regard, the author considers it expedient to study the aging of postmitotic cells in experiments on stationary cell cultures, which can accelerate, in particular, the deciphering of the mechanisms of accumulation of beta-amyloid and senile pigments such as lipofuscin in neurons. The need for clinical studies of AD is noted as complementary to experimental work, although the first ones are much more expensive and time-consuming. Only confirmation in human studies of the effectiveness of drugs developed in experiments on model animals will allow them to be recommended for use in the clinical practice.

Keywords: *Alzheimer's disease, aluminum, free radicals, aging, cell proliferation, beta-amyloid, postmitotic cells, non-senescing organisms, freshwater hydra*

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. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}

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

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение, 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. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}

¹*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;*

²*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 приставленного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

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

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

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *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., Казённых 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 — CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

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

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

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

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется 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 сокращенных названий журналов можно найти [здесь](#)

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

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