

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 78 • № 4 • 2023 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

- Киселевский Д.Б., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Действие нейромедиаторов на программируемую клеточную смерть и образование активных форм кислорода в эпидермисе листьев гороха 227
- Сингх-Пальчевская Л., Шайтан А.К. Разнообразие гистонов H2A и их влияние на структурные свойства нуклеосомы. 235
- Воробьева Н.В. Участие митоген-активируемых протеинкиназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек. 243
- Тиморшина С.Н., Попова Е.А., Кулешова К.И., Акьол А.К., Осмоловский А.А. Кератинолитический потенциал микромицета *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 и сравнение его ферментов с коммерческим препаратом кератиназы 250
- Воронина Я.А., Кузьмин В.С. Влияние пробенецида на проаритмические эффекты активации альфа-1-адренорецепторов в атриовентрикулярном узле сердца крысы. 258
- Репкова М.Н., Мазурков О.Ю., Филиппова Е.И., Проценко М.А., Мазуркова Н.А., Челобанов Б.П., Левина А.С., Зарытова В.Ф. Олигорибонуклеотид-содержащие наноконплексы на основе наночастиц аминопропилсиланола как эффективные ингибиторы репликации вируса гриппа А 267

Краткие сообщения

- Кижина А.Г., Машинская М.С., Панова Э.В., Илюха В.В. Влияние различных сахарозаменителей на содержание гликогена лейкоцитов крови и состав лейкоцитарной формулы у мышей C57BL/6 273

Обзоры

- Моргунова Г.В., Хохлов А.Н. Препараты с сенолитической активностью: перспективы и возможные ограничения 278

- Указатель статей, опубликованных в журнале «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» в 2023 г. 285

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

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 78 • No. 4 • 2023 • OCTOBER — DECEMBER

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Research articles

- Kiselevsky D.B., Oleskin A.V., Samuilov V.D. The effect of neurotransmitters on programmed cell death and formation of reactive oxygen species in the epidermis of pea leaves 227
- Singh-Palchevskaia L., Shaytan A.K. Diversity of H2A histones and their implications for nucleosome structural properties 235
- Vorobjeva N.V. Involvement of mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 as well as protein kinase B Akt1/2 in the formation of neutrophil extracellular traps. . . 243
- Timorshina S.N., Popova E.A., Kuleshova K.I., Akyol A.K., Osmolovskiy A.A. Keratinolytic potential of micromycete *Aspergillus clavatus* VKPM F-1593 and comparison of its enzymes with the commercial keratinase preparation 250
- Voronina Y.A., Kuzmin V.S. The effect of probenecid on α -1-adrenoceptor stimulation induced proarrhythmic conduction in the atrioventricular node of rat heart. 258
- Repkova M.N., Mazurkov O.Yu., Filippova E.I., Procenko M.A., Mazurkova N.A., Chelobanov B.P., Levina A.S., Zarytova V.F. Oligoribonucleotide-containing nanocomplexes based on aminopropylsilanol nanoparticles as effective inhibitors of influenza A virus replication. 267

Short communications

- Kizhina A.G., Mashinskas M.S., Panova E.V., Ilyukha V.V. Effect of different sweeteners on glycogen content of blood leukocytes and differential leukocyte counts in C57BL/6 mice 273

Reviews

- Morgunova G.V., Khokhlov A.N. Drugs with senolytic activity: prospects and possible limitations 278

- Index of papers published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2023 . . . 285

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.175.82

Действие нейромедиаторов на программируемую клеточную смерть и образование активных форм кислорода в эпидермисе листьев гороха

Д.Б. Киселевский^{1,*} , А.В. Олескин² , В.Д. Самуилов¹

¹Кафедра иммунологии и ²кафедра 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: dkiselevs@mail.ru

Нейромедиаторы обнаружены не только у животных, но и у других живых организмов, включая растения. Однако данные о функциях этих соединений в растительном мире далеко не полны, в частности, не исследован вопрос об их влиянии на гибель растительных клеток. В настоящей работе испытано действие нейромедиаторов на программируемую гибель клеток и образование активных форм кислорода (АФК) у растений. Программируемую гибель клеток регистрировали по разрушению их ядер, а АФК определяли с помощью 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Использовали дофамин, норадреналин, серотонин, гистамин, ацетилхолин и его синтетический аналог ацетилтиохолин. Катехоламины дофамин и норадреналин в концентрациях 0,01–1 мМ подавляли разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе листьев гороха, вызванное KCN. Серотонин и ацетилхолин в концентрациях 1–3 мМ, напротив, усиливали KCN-индуцированное разрушение ядер. Гистамин и ацетилтиохолин не оказывали влияния на KCN-зависимое разрушение ядер в концентрациях 0,01–3 мМ. Ацетилтиохолин в концентрации 3 мМ, в отличие от природных нейромедиаторов, вызывал разрушение ядер устьичных клеток в отсутствие KCN. Дофамин, норадреналин и серотонин подавляли образование АФК в эпидермисе листьев гороха, вызванное менадионом. Гистамин, ацетилхолин и ацетилтиохолин не обладали подобным эффектом. Результаты показывают, что у растений дофамин, норадреналин и серотонин обладают свойствами антиоксидантов. Кроме того, дофамин и норадреналин могут защищать клетки от гибели.

Ключевые слова: нейромедиаторы, биогенные амины, программируемая гибель клеток, активные формы кислорода, горох

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-1

Введение

Нейромедиаторы — это низкомолекулярные соединения различной химической природы; важными их представителями являются биогенные амины (дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин, гистамин и др.) и ацетилхолин [1]. Наиболее известная их функция у животных — участие в передаче возбуждения от клетки к клетке. Нейромедиаторы выполняют и иные функции. Так, гистамин играет важную роль в иммунорегуляции и аллергии, а также участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, кроветворения, эмбрионального развития и регенерации [2].

Эти соединения имеются не только у животных, но и у других организмов, включая растения.

Содержание нейромедиаторов в растениях зависит от вида и тканевой локализации, но в целом оно сравнимо с их концентрацией у животных [1].

Функции нейромедиаторов у растений не связаны с передачей нервных импульсов, поэтому применительно к растениям корректнее обозначить их термином «биомедиаторы» [1]. Эти соединения участвуют в формировании органов, цветении, транспорте ионов, фотосинтезе, циркадных ритмах, созревании плодов, фотоморфогенезе (зависимом от света процессе развития), адаптации к изменениям в окружающей среде. Такие биогенные амины, как катехоламины, были обнаружены у 28 видов из 18 тестируемых семейств растений [3]. Особо следует отметить, что повышенное количество дофамина

(1–4 мг/г свежей массы) содержится в цветах и плодах, например, соцветиях *Agaseae* и мякоти плодов бананов [4].

Биогенные амины, в частности катехоламины, выступают как факторы ответа на стресс. При повреждении листьев картофеля в них существенно возрастали концентрации дофамина, норадреналина и адреналина. Уровень дофамина повышался в тканях поврежденного кактуса *Portulacca callus* [4].

Важными регуляторами развития растений на всех этапах, от прорастания семян до цветения, являются также серотонин и его производное мелатонин [5]. Так, серотонин ускорял рост побегов у *Hippeastrum hybridum* (у которого он также способствовал прорастанию семян) и *Mimosa pudica*. У растений риса серотонин задерживал процессы старения. Серотонин играл регуляторную роль в процессах формирования кончиков корней растений. Серотонин и мелатонин взаимодействуют в тканях растений с такими важными регуляторными соединениями, как окись азота, салициловая и жасмоновая кислоты [6].

Ацетилхолин синтезируется, по крайней мере, 65 видами цветковых растений, относящихся к 33 различным семействам. Это соединение в высокой концентрации содержится в жгучих волосках крапивы [3]. При экзогенной обработке он стимулирует рост цветковых растений (томатов, пшеницы, коровьего гороха, редьки посевной, листового салата бамбукового), способствует их цветению, ускоряет движение устьиц, усиливает действие фитохромной системы, снижает образование газообразного фитогормона этилена, препятствует сворачиванию листьев. В то же время добавление к среде культивирования ацетилхолина подавляло рост корневых волосков у резушки Таля [6].

Несмотря на изложенные выше данные, в литературе отсутствуют сведения о том, какое влияние биомедиаторы оказывают на гибель клеток растений. Чтобы заполнить этот пробел, проведено настоящее исследование.

Выделяют два типа гибели животных клеток: непрограммируемая (некроз) и регулируемая, или программируемая, клеточная смерть (ПКС), которая включает различные формы: апоптоз, аутофагию, пироптоз, некроптоз, ферроптоз, нетоз и другие [7]. Растениям присущи особые формы ПКС, обладающие чертами апоптоза, некроптоза и пироптоза [8]. ПКС у растений происходит в онтогенезе в процессе развития репродуктивных органов, формирования особых тканей (проводящих сосудов, аэренхимы), формирования и опадения листьев, а также в результате иммунной реакции растения в ответ на внедрение патогена — гиперчувствительного ответа [9, 10]. Гибель клеток может регулироваться различными низкомолекулярными соединениями. Важную

роль в реализации ПКС у растений играют энергообеспечение и активные формы кислорода (АФК) [11], поэтому, например, антиоксиданты и агенты или условия, действующие на энергетический метаболизм, оказывали влияние на гибель клеток [12].

В настоящей работе использовали биогенные амины дофамин и норадреналин (катехоламины), серотонин, гистамин, а также ацетилхолин и его синтетический аналог ацетилтиохолин (рис. 1). Целью настоящей работы стало испытание действия этих биомедиаторов на ПКС и образование АФК у растений.

Материалы и методы

Объект исследования. Опыты проводили на пленках эпидермиса, изолированных с нижней поверхности листьев 13–24-суточных проростков гороха *Pisum sativum* L. сорта Альфа. Это монослой из клеток двух типов: замыкающие клетки устьиц (устьичные клетки) и основные клетки эпидермиса (эпидермальные клетки). В отличие от устьичных клеток, эпидермальные клетки не фотосинтезируют, так как не содержат хлоропластов. Горох выращивали при 18–26°C в условиях периодического освещения (свет/темнота — 16/8 ч) металлогалогеновой лампой ДРiЗ Reflux (Рефлекс-С, Россия), 250 Вт, с интенсивностью $\sim 100 \text{ мкЕ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Интенсивность света измеряли сенсором Quantitherm PAR/Temp (Hansatech, Великобритания). Пленки эпидермиса отделяли от нижней поверхности листьев пинцетом.

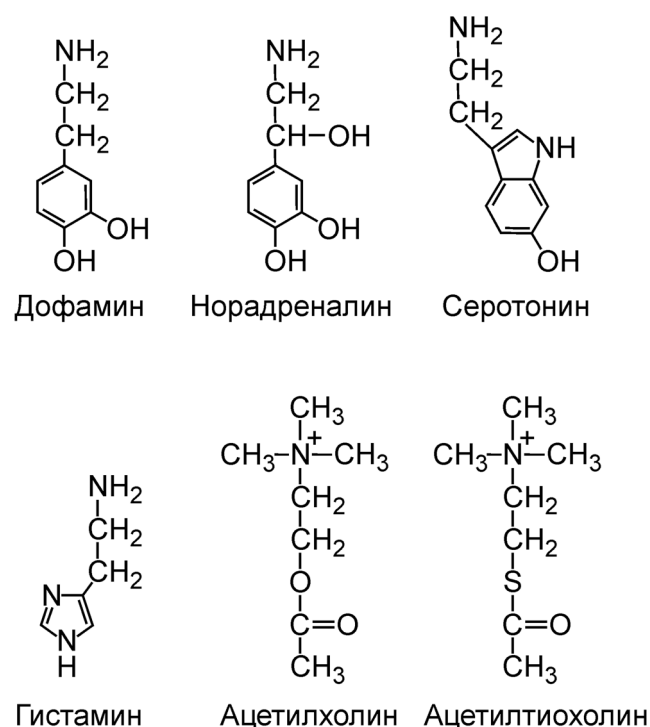


Рис. 1. Структура биомедиаторов, использованных в работе.

Гибель клеток. ПКС регистрировали по разрушению клеточных ядер [12]. Пленки эпидермиса помещали в ячейки 6- или 12-луночных культуральных полистирольных планшетов (Greiner Bio-One, Австрия) с 2 мл бидистиллированной воды, добавляли реагенты (их состав и концентрация отмечены на рисунках или в подписях к ним) и инкубировали 22–24 ч. Контроль — без добавок реагентов. Условия экспериментов представлены в подписях к рисункам.

После инкубации эпидермис обрабатывали 5 мин фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5:5:1:1), промывали 10 мин этанолом и 5 мин водой для удаления фиксатора, затем окрашивали 40 мин гематоксилином Карацци. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водой и исследовали на световом микроскопе Primo Star (Carl Zeiss, Германия). В каждом варианте опыта определяли долю устьичных клеток с разрушенными ядрами (лишенных ядер).

Образование активных форм кислорода. АФК в клетках определяли по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), образующегося из нефлуоресцирующего диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCFH-DA). DCFH-DA проникает в клетки, дезацетируется внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, преимущественно H_2O_2 с участием пероксидаз, превращаясь во флуоресцирующий DCF [13]. Его окисляют также гидроксильный радикал ($OH^\bullet$) и другие свободнорадикальные соединения, но не супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$) [14]. В образование DCF могут быть вовлечены ионы металлов переменной валентности и цитохром *c*, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [15].

Менадион (2-метил-1,4-нафтохинон, витамин K_3) применяли в качестве агента, вызывающего продукцию АФК в клетках. Он восстанавливается различными ферментами, осуществляющими окислительно-восстановительные реакции, в том числе компонентами дыхательной и фотосинтетической электронтранспортных цепей, и окисляется кислородом с образованием $O_2^{\bullet-}$, который затем в реакции дисмутации продуцирует H_2O_2 [16–18].

В спектрофотометрическую кювету из полистирола (объемом 4 мл) вносили 2 мл среды инкубации: буфер 50 мМ Трицин–KOH (pH 7,8) с 0,4 М сахарозы, 35 мМ NaCl и 1 мМ $MgCl_2$. На полистирольную пластинку наносили силиконовый гель, с помощью которого приклеивали к пластинке пленку эпидермиса. Пластинку с эпидермисом помещали в кювету со средой инкубации вертикально так, чтобы угол между плоскостью пластинки и стенками кюветы составлял 45°. В среду инкубации последовательно добавляли DCFH-DA, менадион и другие реагенты. Флуоресценцию DCF возбуждали светом 485–495 нм

и регистрировали при 515–525 нм с помощью флуориметра VersaFluor (Bio-Rad, США) и компьютерной программы ФлуоСпектр 1.2 (МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия).

Статистическая обработка данных. В опытах с гибелью клеток (микроскопия) в каждом варианте опыта исследовали 300–750 клеток в 2–3 пленках эпидермиса. На диаграммах отмечены средние арифметические значения $\pm$ 95%-ные доверительные интервалы. Для проверки гипотезы о значимых отличиях средних значений полученных выборок (контроль или вариант с KCN в сравнении с одним из вариантов опыта) применяли *t*-критерий Стьюдента при уровне статистической значимости (*p*) равном 0,01. Эксперименты с измерением АФК повторяли 2–3 раза. Приводятся результаты типичных экспериментов.

Результаты и обсуждение

Испытано действие биомедиаторов, функционирующих в качестве нейромедиаторов в нервной системе животных, на программируемую гибель устьичных клеток гороха, которую определяли по разрушению клеточных ядер. В качестве индуктора гибели клеток использовали KCN [12]. В клетках растений KCN ингибирует цитохром *c*-оксидазу в митохондриях, рибулозобисфосфаткарбоксилазу в хлоропластах [19] и ферменты, утилизирующие АФК: каталазу, пероксидазы и Cu, Zn-супероксиддисмутазу [20]. KCN вызывает ПКС — об этом свидетельствует ряд признаков: разрушение клеточных ядер с образованием их фрагментов, конденсация ядерного хроматина, межнуклеосомная фрагментация ДНК, а также чувствительность к антиоксидантам, к ингибиторам синтеза белка и к воздействиям, влияющим на энергетический метаболизм [12, 21, 22].

Обработка пленок эпидермиса KCN при освещении в течение суток вызывала разрушение ядер у 60–80% устьичных клеток (рис. 2). В темноте KCN разрушал ядра около 40% клеток (рис. 2, Г). Дофамин и норадреналин в концентрациях 0,01–1 мМ подавляли KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток на свету (рис. 2, А). С увеличением их концентрации до 3 мМ защитное действие прекращалось. Серотонин и ацетилхолин в концентрации 1–3 мМ, напротив, усиливали разрушение ядер, вызванное KCN на свету (рис. 2, Б). Гистамин и ацетилтиохолин не оказывали влияния на KCN-зависимое разрушение ядер в испытанном диапазоне концентраций (рис. 2, В). При инкубации в темноте биомедиаторы действовали сходным образом — дофамин и норадреналин подавляли разрушение ядер, вызванное KCN, а другие испытанные соединения не вызывали подобного эффекта (рис. 2, Г).

Могут ли биомедиаторы вступать в химическую реакцию с цианидом в наших эксперимен-

тах, влияя тем самым на их результаты? По-видимому, нет. Синильная кислота формирует фенольные соединения в реакции Гаттермана, однако для этого требуются HCl и хлориды некоторых металлов в качестве катализаторов. Полученные данные (рис. 2) показывают, что добавка биомедиаторов в концентрации 3 мМ, близкой к концентрации KCN (2,5 мМ), не предотвращала разрушения ядер, чего можно ожидать, если

бы KCN был израсходован в результате его химического взаимодействия с биомедиаторами. Кроме того, эффект цианида на фоне эквимольных концентраций адреналина, норадреналина и серотонина был ранее продемонстрирован в опытах на пупочных венах и артериях человека [23].

Среди испытанных биомедиаторов только ацетилтиохсин вызывал разрушение ядер сам по

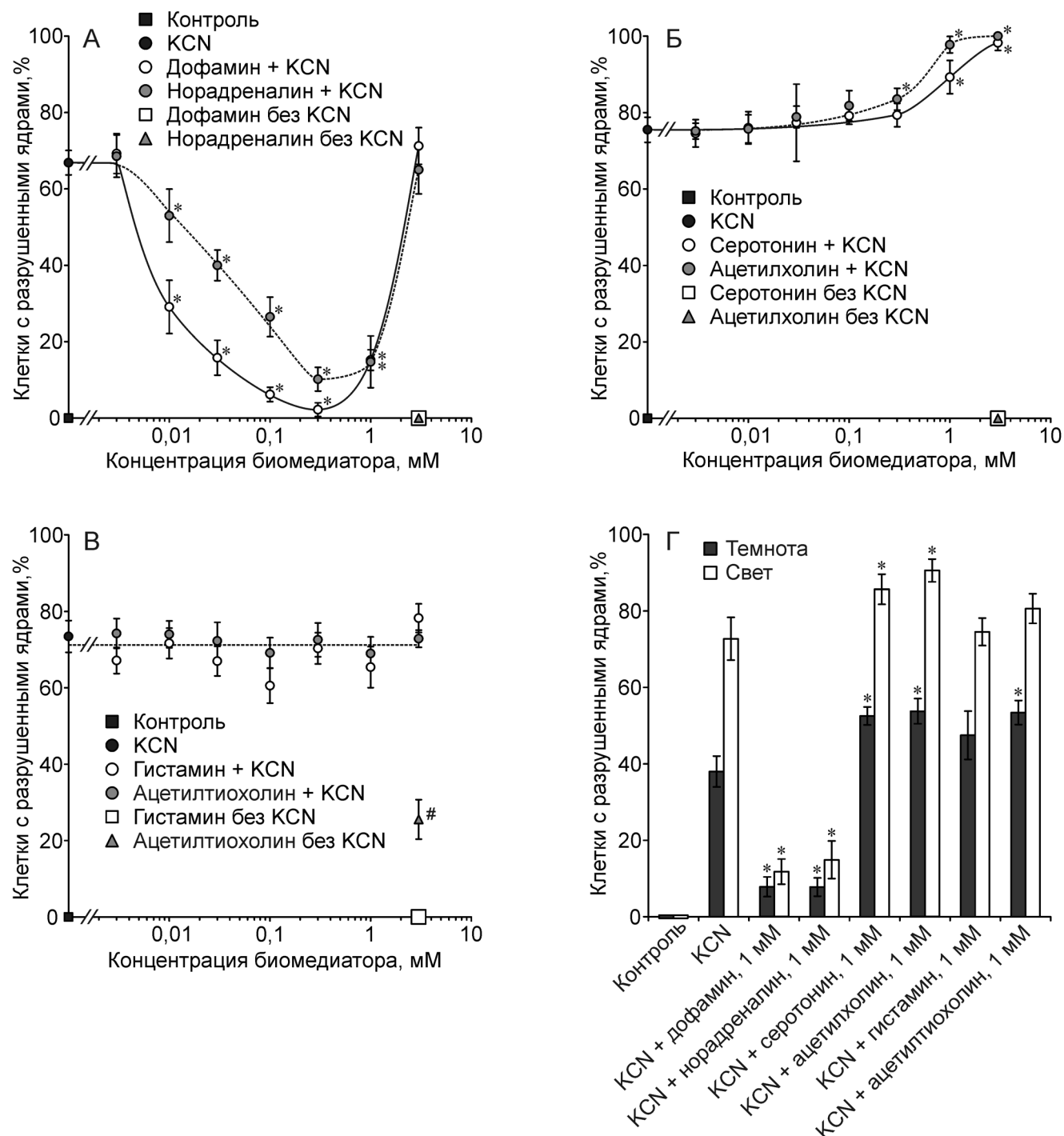


Рис. 2. Действие биомедиаторов на KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха. К пленкам эпидермиса добавляли биомедиаторы, KCN (2,5 мМ) и инкубировали на свету (А–Г) или в темноте (Г). Отмечены значения, имеющие достоверные отличия ($p < 0,01$): контроль (без добавок) сравнивали с вариантами опыта «биомедиатор без KCN» (#); вариант с KCN (без биомедиаторов) сопоставляли с вариантами «биомедиатор + KCN» (*).

себе, без добавления KCN (рис 2, В), в отличие от его природного аналога ацетилхолина. Вероятно, гибель клеток растений могла быть обусловлена тиохолином — продуктом гидролиза ацетилтиохолина холинэстеразами. Холинэстеразная активность присуща растениям, особенно представителям семейства бобовых [1], включающего горох. Тиохоллин относится к тиолам, которые, как известно, индуцируют апоптоз в клетках млекопитающих [24]. Ацетилтиохоллин в комбинации с KCN не усиливал разрушение ядер (рис. 2, В), что может объясняться ингибиторным действием цианида на активность холинэстераз.

Исследовано также действие биомедиаторов на образование АФК в пленках эпидермиса из листьев гороха, которое регистрировали по флуоресценции DCF после добавки в среду инкубации DCFH-DA (рис. 3). Менадион стимулировал генерацию АФК — увеличивал в 3,5 раза скорость образования флуоресцирующего DCF (рис. 3, А). Эффект менадиона снижался добавкой антиоксиданта нитросинего тетразолия, реагирующего с супероксидным анион-радикалом ($O_2^{\cdot-}$) с образованием формазана [25].

Дофамин, норадреналин и серотонин подавляли образование АФК в пленке эпидермиса (рис. 3, Б–Г). Добавка дофамина, норадреналина или серотонина (в концентрации 0,1 мМ) снижала скорость образования DCF на 28, 29 и 20% соответственно, в сравнении с его генерацией после добавки DCFH-DA и менадиона (без биомедиаторов). При концентрации дофамина, норадреналина или серотонина в среде инкубации, равной 1 мМ, скорость образования DCF уменьшалась более чем вдвое: на 65, 61 и 56% соответственно.

Гистамин, ацетилхолин и ацетилтиохоллин не обладали подобным действием (рис. 3, Д–Ж). Напротив, гистамин в концентрации 1 мМ увеличивал скорость образования DCF в эпидермисе на 37%, ацетилхолин — на 25%, ацетилтиохоллин — на 10%.

Нитросиний тетразолий в 1,7–2,5 раза уменьшал скорость образования АФК на фоне действия всех испытанных биомедиаторов. Добавка KCN, используемого здесь в качестве ингибитора пероксидаз, прекращала зависимое от пероксидазной активности образование DCF (рис. 3, Б–Ж).

Антиоксидантное действие продемонстрировали фенольные биомедиаторы с одной или двумя гидроксильными группами, связанными с ароматическим кольцом в молекуле (рис. 1). Из них дофамин и норадреналин с двумя ОН-группами, но не серотонин, защищали клетки растений от гибели, вызванной KCN (рис. 2, А, Б). В мировой литературе есть множество работ, свидетельствующих об антиоксидантных свойствах различных фенольных соединений [26–28].

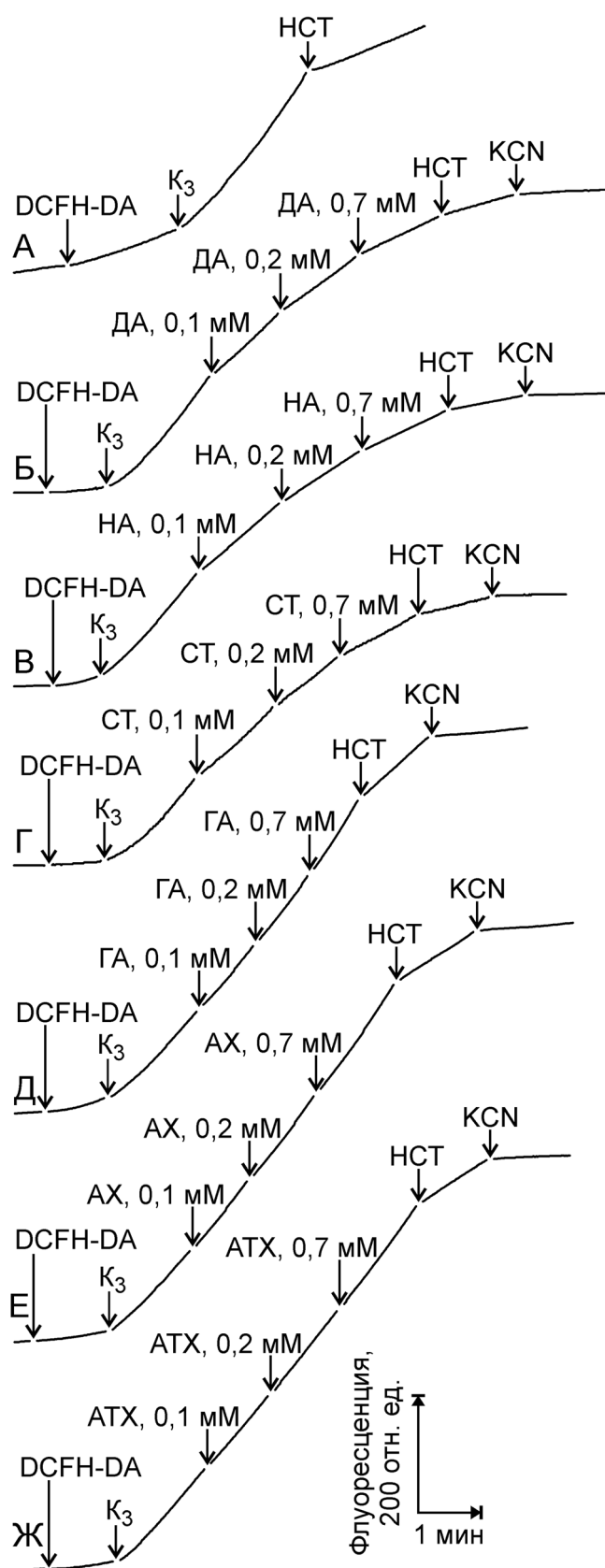


Рис. 3. Действие дофамина (ДА), норадреналина (НА), серотонина (СТ), гистамина (ГА), ацетилхолина (АХ) и ацетилтиохолина (АТХ) на скорость образования флуоресцирующего DCF из нефлуоресцирующего DCFH-DA в пленках эпидермиса из листьев гороха. Добавки: 20 мкМ DCFH-DA, 0,1 мМ менадиона (K_3), 0,2 мМ нитросинего тетразолия (НСТ), ДА, НА, СТ, ГА, АХ, АТХ, 2,5 мМ KCN.

В литературе имеются данные об антиоксидантном действии фенольных биомедиаторов — дофамина и норадреналина [29, 30]. *In vitro* их антиоксидантная активность была сравнима с эффектом антиоксиданта α -токоферола (витамина Е), а в эффективности утилизации супероксидного анион-радикала α -токоферол уступал дофамину. Антиоксидантные свойства проявлял также биогенный амин тирамин, содержащий только одну гидроксильную группу в фенольном кольце молекулы, подобно серотонину [30]. Серотонин также демонстрировал антиоксидантный эффект *in vitro* и *in vivo* [31, 32]. Дофамин, норадреналин и серотонин могут использоваться в качестве субстратов окисления пероксидазы, утилизирующей H_2O_2 [32, 33].

С другой стороны, биогенные амины могут обладать прооксидантной активностью и вызывать окислительный стресс, благоприятствуя развитию нейродегенеративных заболеваний. Участвуя в пероксидазной реакции, они способны поддерживать окисление низкомолекулярных внутриклеточных соединений, которые проявляют свойства антиоксидантов (аскорбат, НАДН), а также образовывать радикалы, вызывающие окислительное повреждение клеточных компонентов [34]. Дофамин усиливал генерацию АФК и гибель нейронов [35].

Известно, что эффект дофамина зависит от pH: при слабокислых и нейтральных значениях pH он подавлял перекисное окисление метилинолеата в мицеллах детергента Тритона X-100, при pH = 8 этот эффект исчезал, а при pH $\geq$ 9 дофамин, напротив, усиливал перекисное окисление. Прооксидантный эффект дофамина и других катехоламинов объясняется восстановлением O_2 с образованием супероксидного анион-радикала в реакции с окисленным катехоламином. При этом O_2 предпочтительнее реагирует не с незаряженным радикалом семихинона катехоламина, а с анион-радикалом, образующимся в растворах с щелочными значениями pH [36]. Предположительно, сходными свойствами обладают и другие фенольные биомедиаторы.

В проведенных в данной работе экспериментах наблюдались исчезновение защитного дей-

ствия дофамина и норадреналина при повышении их концентрации до 3 мМ (рис. 2, А) и губительное действие серотонина в концентрации 1–3 мМ (рис. 2, Б), что может быть связано с проявлением прооксидантной активности этих соединений. KCN, увеличивающий значение pH в водных растворах в результате защелачивания, будет способствовать уменьшению анти- и повышению прооксидантных свойств фенольных биомедиаторов.

Ранее в экспериментах с растениями наблюдали преимущественно антиоксидантный эффект биомедиаторов. Так, в корнях сои дофамин в концентрациях 0,1–1 мМ оказывал влияние на активность ферментов, связанных с утилизацией АФК, уменьшал содержание АФК ($O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2) и подавлял перекисное окисление липидов [37]. Результаты, полученные в настоящей работе, соответствуют этим наблюдениям.

Заключение

Получены данные о влиянии биомедиаторов (обладающих нейромедиаторной функцией у животных) на ПКС и образование АФК у растений. Катехоламины дофамин и норадреналин в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ защищали клетки от гибели, вызванной обработкой KCN. Серотонин, гистамин, ацетилхолин и ацетилтиохолин не проявляли цитопротекторных свойств. Катехоламины, а также серотонин, в отличие от остальных испытанных соединений, действовали как антиоксиданты, снижая образование АФК в эпидермисе листьев (при pH среды ниже 8). В целом, результаты настоящего исследования дополняют данные о свойствах биомедиаторов в живых организмах и показывают, что биомедиаторы из группы катехоламинов могут защищать клетки растений от гибели, вызванной цианидом; катехоламины и серотонин предохраняют клетки от окислительного стресса.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121042600047-9. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рощина В.В. *Нейротрансмиттеры — биомедиаторы и регуляторы растений*. Пушино: Институт биологии клетки РАН; 2010. 83 с.
2. Simons F.E.R., Simons K.J. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;128(6):1139–1150.e4.
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. Kulma A., Szopa J. Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Sci.* 2007;172(3):433–440.
5. Erland L.A.E., Saxena P.K. Melatonin and serotonin in plant morphogenesis and development. *Neurotransmitters in plants: Perspectives and applications*. Eds. A. Ram-

- akrishna and V.V. Roshchina. Boca Raton: CRC Press; 2018:57–70.
6. Ramakrishna A., Mukherjee S. New insights on neurotransmitter signaling mechanisms in plants. *Plant Signal. Behav.* 2020;5(6):1737450.
 7. Vitale I., Pietrocola F., Guilbaud E., et al. Apoptotic cell death in disease – Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ.* 2023;30(5):1097–1154.
 8. Mukhtar M.S., McCormack M.E., Argueso C.T., Pajeroska-Mukhtar K.M. Pathogen tactics to manipulate plant cell death. *Curr. Biol.* 2016;26(13):R608–R619.
 9. Van Hautegeem T., Waters A.J., Goodrich J., Nowack M.K. Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends Plant Sci.* 2015;20(2):102–113.
 10. Pitsili E., Phukan U.J., Coll N.S. Cell death in plant immunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2020;12(6):a036483.
 11. Ye C., Zheng S., Jiang D., Lu J., Huang Z., Liu Z., Zhou H., Zhuang C., Li J. Initiation and execution of programmed cell death and regulation of reactive oxygen species in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(23):12942.
 12. Samuilov V.D., Lagunova E.M., Kiselevsky D.B., Dzyubinskaya E.V., Makarova Ya.V., Gusev M.V. Participation of chloroplasts in plant apoptosis. *Biosci. Rep.* 2003;23(2–3):103–117.
 13. LeBel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 1992;5(2):227–231.
 14. Wrona M., Patel K., Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free. Radic. Biol. Med.* 2005;38(2):262–270.
 15. Karlsson M., Kurz T., Brunk U.T., Nilsson S.E., Frennsson C.I. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.* 2010;428(2):183–190.
 16. Goldberg B., Stern A. Production of superoxide anion during the oxidation of hemoglobin by menadione. *Biochim. Biophys. Acta.* 1976;437(2):628–632.
 17. Hassan H.M., Fridovich I. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979;196(2):385–395.
 18. Szilagy J.T., Fussell K.C., Wang Y., Jan Y.H., Mishin V., Richardson J.R., Heck D.E., Yang S., Aleksunes L.M., Laskin D.L., Laskin J.D. Quinone and nitrofurantoin redox cycling by recombinant cytochrome b₅ reductase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018;359:102–107.
 19. Kobayashi Y., Heber U. Rates of vectorial proton transport supported by cyclic electron flow during oxygen reduction by illuminated intact chloroplasts. *Photosynth. Res.* 1994;41(3):419–428.
 20. Huseynova I.M., Aliyeva D.R., Aliyev J.A. Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant Physiol. Biochem.* 2014;81:54–60.
 21. Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Bakeeva L.E., Samuilov V.D. Programmed cell death in plants: Effect of protein synthesis inhibitors and structural changes in pea guard cells. *Biochemistry (Mosc.)*. 2006;71(4):395–405.
 22. Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Shestak A.A., Samuilov V.D. Death of stoma guard cells in leaf epidermis under disturbance of energy provision. *Biochemistry (Mosc.)*. 2006;71(10):1120–1127.
 23. Tunçel N., Aydın Y., Tikiz H. The effect of three products of cigarette smoke (cyanide, thiocyanate and nicotine) on the concentration-response curves of 5-hydroxytryptamine, norepinephrine and epinephrine in the isolated human umbilical veins and arteries. *Pharmacol. Toxicol.* 1994;74(2):84–88.
 24. Held K.D., Sylvester F.C., Hopcia K.L., Biaglow J.E. Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. *Radiat. Res.* 1996;145(5):542–553.
 25. Van Noorden C.J., Butcher R.G. The involvement of superoxide anions in the nitro blue tetrazolium chloride reduction mediated by NADH and phenazine methosulfate. *Anal. Biochem.* 1989;176(1):170–174.
 26. Kagan V.E., Tyurina Y.Y. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998;854(1):425–434.
 27. Duthie G., Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000;11(1):43–47.
 28. Rahman M.M., Rahaman M.S., Islam M.R., Rahman F., Mithi F.M., Alqahtani T., Almikhlaifi M.A., Alghamdi S.Q., Alruwaili A.S., Hossain M.S., Ahmed M., Das R., Emran T.B., Uddin M.S. Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. *Molecules*. 2021;27(1):233.
 29. Liu Q., Gao T., Liu W., Liu Y., Zhao Y., Liu Y., Li W., Ding K., Ma F., Li C. Functions of dopamine in plants: a review. *Plant Signal. Behav.* 2020;15(12):1827782.
 30. Yen G.-C., Hsieh C.-L. Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997;61(10):1646–1649.
 31. Erland L.A.E., Turi C.E., Saxena P.K. Serotonin: An ancient molecule and an important regulator of plant processes. *Biotechnol. Adv.* 2016;34(8):1347–1361.
 32. Huether G., Schuff-Werner P. Platelet serotonin acts as a locally releasable antioxidant. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996;398:299–306.
 33. Kalyanaraman B., Felix C.C., Sealy R.C. Peroxidatic oxidation of catecholamines. A kinetic electron spin resonance investigation using the spin stabilization approach. *J. Biol. Chem.* 1984;259(12):7584–7589.
 34. Siraki A.G., O'Brien P.J. Prooxidant activity of free radicals derived from phenol-containing neurotransmitters. *Toxicology*. 2002;177(1):81–90.
 35. Sango J., Kakihana T., Takahashi M., Katsuragi Y., Anisimov S., Komatsu M., Fujii M. USP10 inhibits the dopamine-induced reactive oxygen species-dependent apoptosis of neuronal cells by stimulating the antioxidant Nrf2 activity. *J. Biol. Chem.* 2022;298(1):101448.
 36. Jodko-Piórecka K., Litwinienko G. Antioxidant activity of dopamine and L-DOPA in lipid micelles and their cooperation with an analogue of α -tocopherol. *Free Radic. Biol. Med.* 2015;83:1–11.
 37. Gomes B.R., Siqueira-Soares R.de C., Dos Santos W.D., Marchiosi R., Soares A.R., Ferrarese-Filho O. The effects of dopamine on antioxidant enzymes activities and reactive oxygen species levels in soybean roots. *Plant Signal. Behav.* 2014;9(12):e977704.

Поступила в редакцию 21.06.2023

После доработки 09.11.2023

Принята в печать 03.12.2023

RESEARCH ARTICLE

The effect of neurotransmitters on programmed cell death and formation of reactive oxygen species in the epidermis of pea leaves

D.B. Kiselevsky^{1,*} , A.V. Oleskin² , V.D. Samuilov¹

¹Department of Immunology and ²Department of General Ecology and Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: dkiselevs@mail.ru

Neurotransmitters are found not only in animals, but also in other living organisms, including plants. They are found in other living organisms, including plants. However, the data on the functions of these compounds in the plant world are far from being comprehensive. In particular, the issue concerning their impact on plant cell death still awaits further research. In the present work, the effects of neurotransmitters on programmed cell death and the formation of reactive oxygen species (ROS) in plants were tested. Programmed cell death was estimated from the destruction of cell nuclei, and ROS was determined using 2',7'-dichlorofluorescein. Dopamine, norepinephrine, serotonin, histamine, acetylcholine and its synthetic analog acetylthiocholine were used. The catecholamines dopamine and norepinephrine at concentrations of 0.01–1 mM suppressed the destruction of guard cell nuclei in the epidermis of pea leaves, which was caused by KCN. Serotonin and acetylcholine at a concentration of 1–3 mM, on the contrary, increased the destruction of nuclei that was induced by KCN. Histamine and acetylthiocholine had no effect on KCN-dependent destruction of nuclei at concentrations of 0.01–3 mM. Acetylthiocholine at a concentration of 3 mM, in contrast to natural neurotransmitters, caused the destruction of guard cell nuclei in the absence of KCN. Dopamine, norepinephrine, and serotonin reduced the formation of ROS in the epidermis of pea leaves, which was induced by menadione. Histamine, acetylcholine and acetylthiocholine did not have a similar effect. The results demonstrate that dopamine, norepinephrine and serotonin have antioxidant properties in plants. In addition, dopamine and norepinephrine can prevent cell death.

Keywords: neurotransmitters, biogenic amines, programmed cell death, reactive oxygen species, pea

Funding: The research was carried out as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No 121042600047-9.

Сведения об авторах

Киселевский Дмитрий Борисович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: dkiselevs@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6050-2940>

Олескин Александр Владимирович — докт. биол. наук, проф., проф. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-38-72; e-mail: aoleskin@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6816-1615>

Самуилов Виталий Дмитриевич — докт. биол. наук, проф., гл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: vdsamuilov@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.22

Разнообразие гистонов H2A и их влияние на структурные свойства нуклеосомы

Л. Сингх-Пальчевская , А.К. Шайтан* 

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

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

Ключевым эпигенетическим фактором являются гистоновые белки, которые играют важную роль в динамике хроматина и регуляции активности генов. Они делятся на два обширных класса: канонические гистоны и их варианты. Канонические гистоны экспрессируются в основном в ходе S-фазы клеточного цикла, так как участвуют в упаковке ДНК в процессе деления клетки. Гистоновые варианты — это гены гистонов, которые экспрессируются и регулируют динамику хроматина в ходе всего клеточного цикла. В силу функционального и видового разнообразия выделяют различные семейства вариантов гистонов. Некоторые белки характеризуются незначительными отличиями от канонических гистонов, другие же наоборот могут иметь множество важных структурных и функциональных особенностей, влияющих на стабильность нуклеосомы и динамику хроматина. Для того чтобы оценить вариативность гистонов семейства H2A и их влияние на структуру нуклеосомы, мы провели биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей гистонов семейства H2A. Проведенная кластеризация методом UPGMA позволила выделить два основных подсемейства белков H2A: «короткие» H2A (short H2A) и другие варианты H2A, демонстрирующие более высокую консервативность аминокислотных последовательностей. Также мы построили и проанализировали множественные выравнивания для различных подсемейств гистонов H2A. Важно отметить, что белки подсемейства «коротких» H2A являются не только самыми низко консервативными внутри своего семейства, но и имеют особенности, оказывающие существенное влияние на структурные свойства нуклеосомы. Кроме того, мы провели филогенетический анализ «коротких» гистонов H2A, в результате которого были более детально охарактеризованы подсемейства, соответствующие вариантам H2A.B, H2A.P, H2A.Q, H2A.L.

Ключевые слова: гистон, H2A, гистоновые варианты, нуклеосома, хроматин, анализ последовательностей, биоинформатика, эпигенетика

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

Введение

Изучение механизмов функционирования генома является одной из важнейших задач молекулярной биологии на сегодняшний день. Известно, что существует множество различных эпигенетических факторов, влияющих на активность генов и позволяющих организму функционировать и развиваться. Ключевую роль среди них занимают белки гистоны, которые отвечают за структуру и динамику хроматина.

Большая часть гистонов обеспечивает упаковку новой ДНК, синтезированной в ходе репликации. Они называются каноническими и экспрессируются в основном во время S-фазы клеточного цикла [1]. Экспрессия других гистонов, именуе-

мых вариантами, не зависит от репликации. Они встраиваются в существующие нуклеосомы и регулируют активность и функционирование различных участков генома [2].

Выделяют пять основных типов гистонов: коровые H2A, H2B, H3, H4 и линкерный H1/H5. Каждый из них представлен как канонической формой, так и различными вариантами (за исключением H4, который во многих видах представлен лишь канонической изоформой). Аминокислотные последовательности некоторых гистонов имеют отличия всего в нескольких аминокислотных остатках [2]. Например, вариант H3.3 и канонический H3 [3]. При этом они имеют схожие структурные особенности и схожую функциональную роль.

Другие гистоновые варианты могут характеризоваться значительным количеством различий (идентичность последовательностей менее 25%) [2], а также иметь значимые вариации, влияющие на структуру нуклеосомы. Например, вариант гистона *масгоH2A* обладает дополнительным негистоновым макромономером размером около 30 кДа, благодаря которому он способен связывать производные метаболиты НАД⁺, такие как АДФ-рибоза и поли-АДФ-рибоза [4]. Разнообразие гистонов различимо не только на структурном и функциональном уровнях. Некоторые варианты могут быть специфичны для отдельных таксономических групп или клеточных линий. Например, варианты H2A.W и OO H1.8 присутствуют исключительно в растениях и в ооцитах млекопитающих соответственно [5–10].

В силу своего многообразия гистоновые белки делятся на различные семейства. Однако до сих пор отсутствует систематизированное представление о значимых вариациях аминокислотных последовательностей гистонов и их структурных особенностях. Для того чтобы более детально изучить семейство гистоновых вариантов H2A, мы провели биоинформатический анализ их аминокислотных последовательностей и оценили влияние вариативности вариантов H2A на структуру нуклеосомы.

Материалы и методы

Для проведения комплексного анализа разнообразия гистоновых вариантов H2A были собраны их аминокислотные последовательности. В исследуемый массив данных были отобраны последовательности из курируемого набора базы данных HistoneDB (<https://histdb.intbio.org>) [2]. На основе анализа литературы [5, 9–13], данный набор был расширен последовательностями гистонов, которые принадлежат недавно обнаруженным семействам H2A. В результате было собрано более 200 аминокислотных последовательностей гистонов H2A.

Методы биоинформатического анализа. Чтобы оценить общую вариативность всех аминокислотных последовательностей семейства H2A, была произведена их кластеризация. Для этого было построено филогенетическое дерево с использованием программы ClustalW2 [14] для создания множественного выравнивания и алгоритма UPGMA [15] в качестве простого метода иерархической кластеризации.

Для проведения эволюционного анализа с целью сократить влияние разнообразия неупорядоченных хвостов гистонов были извлечены центральные области глобулярных доменов гистонов, гистоновые фолды (histone fold domain, HFD), являющиеся структурными мотивами, характерными для всех гистонов и состоящими из трех альфа-спиралей, соединенных двумя петлями. Множественные выравнивания полученных последова-

тельностей строились с применением программы MUSCLE [16]. Филогенетические деревья были построены с помощью алгоритмов PhyML [17], в основе которых лежат методы максимального правдоподобия.

Для обнаружения значимых вариаций и структурных особенностей были построены множественные выравнивания с использованием программы MUSCLE [16]. Визуальное представление результатов было получено с применением программного обеспечения texshade [18], которое позволяет не только обрабатывать несколько выравниваний последовательностей, но и имеет специальные режимы для подсвечивания функционально значимых остатков.

Результаты и обсуждение

Кластеризация последовательностей гистоновых белков семейства H2A. В ходе кластеризации были построены и проанализированы филогенетическое дерево и матрица попарной идентичности между аминокислотными последовательностями семейства H2A, представленные на рис. 1. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что гистоны семейства H2A можно разделить на два обширных подсемейства. Состав одного из них представляет собой группу «коротких» гистонов H2A (short H2A), в которую входят подгруппы гистонов H2A.P, H2A.B, H2A.L и H2A.Q, известные из литературы [11, 20, 21]. Другое подсемейство состоит из последовательностей канонических белков и различных вариантов H2A, таких как H2A.X, H2A.Z, *масгоH2A*, H2A.W и H2A.R [1, 4, 5, 9, 11, 22]. Из матрицы попарной идентичности (рис. 1) можно сделать заключение о том, что данные подсемейства имеют разную степень консервативности аминокислотных последовательностей. Так, варианты, относящиеся к «коротким» H2A, демонстрируют очень низкую консервативность по сравнению с остальными вариантами семейства H2A. К тому же, отчетливо выделяются наименее (H2A.P) и наиболее (канонические H2A) консервативные варианты. Опираясь на результаты кластеризации (рис. 1), можно также отметить, что, несмотря на низкую степень сходства аминокислотных последовательностей, в каждом варианте из подсемейства «коротких» H2A выделяются отдельные кластеры последовательностей.

Филогенетический анализ и классификация «коротких» гистоновых белков семейства H2A. Опираясь на филогенетическое дерево (рис. 2А), построенное с помощью алгоритмов максимального правдоподобия с использованием исследуемых последовательностей без неупорядоченных С- и N-хвостов, можно сделать заключение о том, что самыми дивергентными гистонами семейства являются варианты «коротких» H2A, а самыми близкими к ним ортологами являются гистоны недавно обнаруженного варианта H2A.R [7]. Интересно

отметить, что структура дерева указывает на то, что белки канонического H2A и варианта H2A.X разошлись в ходе эволюции не один раз, а в ходе нескольких независимых эволюционных событий. При этом, вероятно, что вариант H2A.X является предшественником канонической формы, так как он играет важную роль в репарации повреждений ДНК [1]. Более того, можно заметить, что некоторые последовательности вариантов H2A.B, H2A.P, H2A.Q, H2A.L, относящихся к подсемейству «коротких» гистонов H2A, образуют отдельные клады (рис. 2Б). Чтобы сопоставить результаты эволюционного анализа с оценкой идентичности последовательностей, мы провели иерархическую кластеризацию гистоновых вариантов «коротких» H2A, используя те же методы, что и на первом этапе нашего исследования. В результате были получены и проанализированы филогенетическое дерево, по-

строенное с помощью метода UPGMA, и матрица попарной идентичности между аминокислотными последовательностями «коротких» H2A (рис. 2В). Мы видим, что варианты семейства «коротких» гистонов H2A могут быть разделены на несколько кластеров. При этом последовательности некоторых кластеров характеризуются достаточно высокой консервативностью (более 70% идентичности). Важно отметить, что в каждый кластер попали последовательности, принадлежащие к одной или нескольким кладам филогенетического дерева. Таким образом, разбиение последовательностей на клады, полученное в результате филогенетического анализа центральных частей гистоновых доменов (гистоновых складок), согласуется с разбиением на основе проведенной нами кластеризации исходных последовательностей, включающих неупорядоченные хвосты (рис. 2Б).

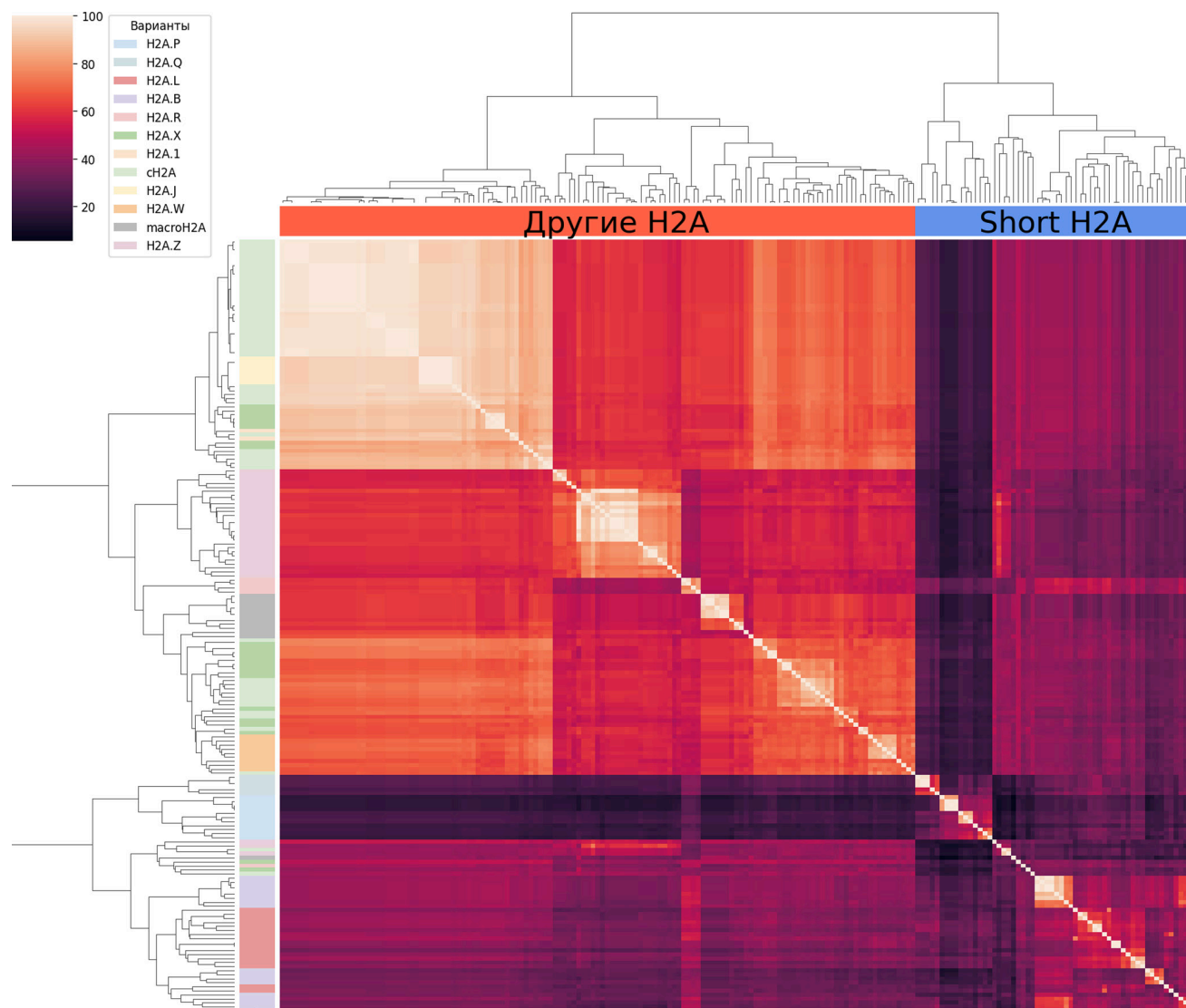


Рис. 1. Матрица попарной идентичности между аминокислотными последовательностями гистонов семейства H2A, полученная в ходе кластеризации гистоновых белков H2A. Цветовая шкала отражает степень идентичности аминокислотных последовательностей. Чем ближе значение к нулю (более темный оттенок), тем ниже идентичность. Слева и сверху представлено дерево иерархической кластеризации гистоновых белков H2A. Цветовая шкала слева определяет название варианта семейства H2A, к которому относится последовательность. Цветовая шкала сверху определяет два кластера гистоновых белков семейства H2A: «короткие» H2A и другие варианты семейства H2A.

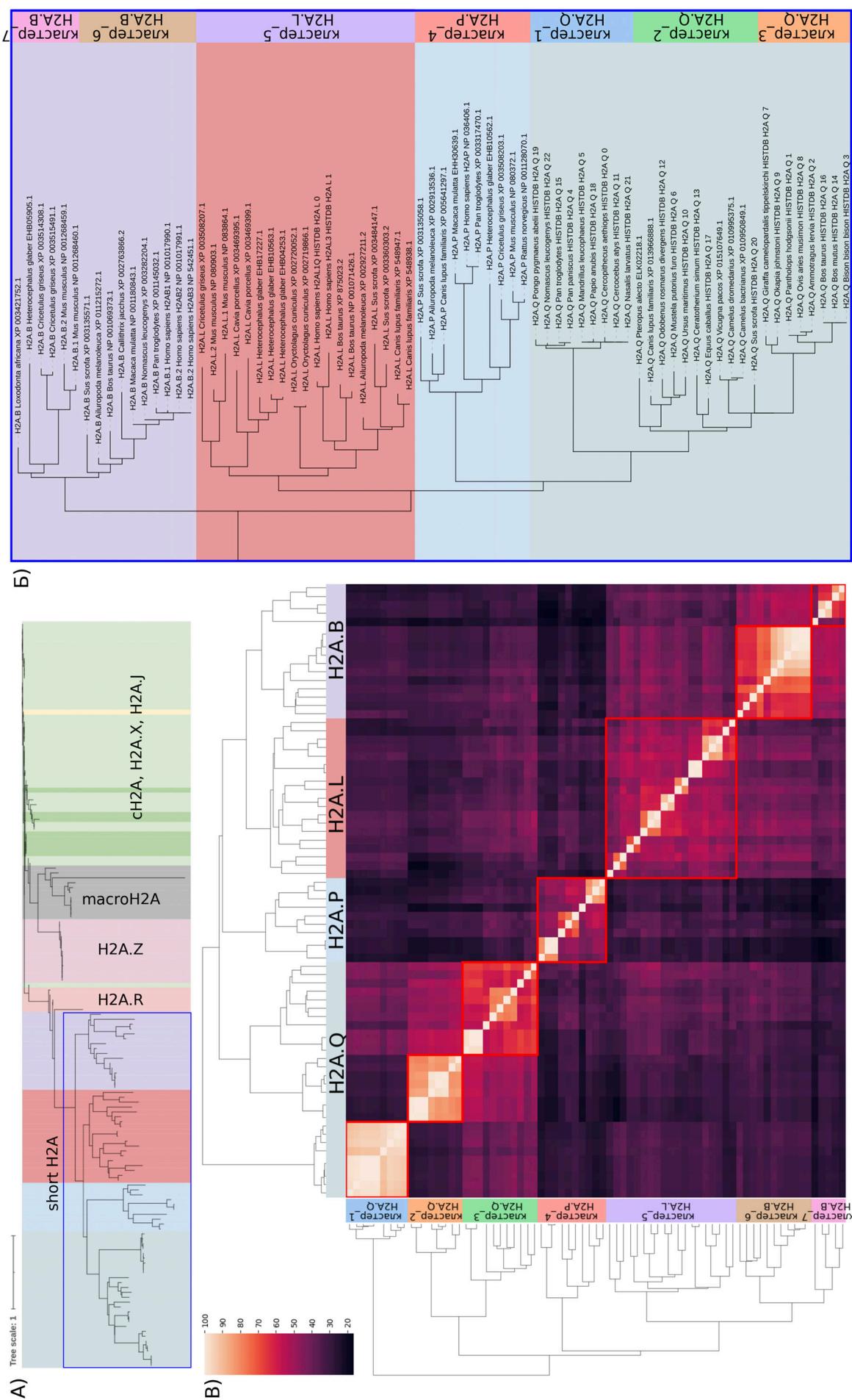


Рис. 2. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей «коротких» гистонов семейства H2A. **А.** Филогенетическое дерево, построенное с помощью методов максимального правдоподобия, для аминокислотных последовательностей центральных частей гистоновых доменов (HFD) «коротких» гистонов H2A. **Б.** Визуализация крупным планом ветвей филогенетического дерева с последовательностями вариантов H2A.В, H2A.Р, H2A.Л, H2A.В, H2A.Р, H2A.Л. Справа на дереве отмечены названия кластеров, полученные в результате кластеризации исходных последовательностей «коротких» гистонов семейства H2A, включающих неупорядоченные хвосты. **В.** Матрица попарной идентичности между аминокислотными последовательностями «коротких» гистонов семейства H2A, полученная в ходе кластеризации «коротких» гистоновых белков H2A. Цветовая шкала слева определяет кластеры «коротких» гистоновых белков H2A. Цветовая шкала сверху определяет название варианта семейства H2A, к которому относится последовательность.

Вариации последовательностей гистоновых белков H2A и их влияние на структуру нуклеосомы. Чтобы охарактеризовать особенности каждого из вариантов семейства H2A, были проанализированы множественные выравнивания аминокислотных последовательностей гистоновых белков семейства H2A. В результате были выявлены различные вариации, являющиеся структурно и функционально значимыми. Важно отметить, что, несмотря на высокую консервативность и одинаковую функциональную роль канонических гистонов, среди их последовательностей также были обнаружены некоторые отличия. Например, аминокислотные последовательности канонического H2A у некоторых протистов (*Alveolata*) характеризуются длинным N-концевым хвостом, а у растений – немного удлиненным C-концевым хвостом. Интересно, что гистоны грибов сильно отличаются от гистонов остальных видов живых организмов. При этом у них отсутствуют две аминокислоты, находящиеся в области «acidic patch», что может приводить к снижению стабильности хроматина [22].

Как показывает анализ множественных выравниваний, вариант H2A.X является наиболее близким к канонической форме гистонов (идентичность аминокислотных последовательностей более 71%). Аминокислотная последовательность гистонического фолда варианта H2A.X отличается от канонического H2A всего в пяти позициях, а область структурного домена «docking domain» – в двух позициях. Вариант H2A.X также интересен тем, что у него на C-концевом хвосте имеется мотив SQE/DΦ (SQAY у дрозофилы), где Φ – представляет собой гидрофобный остаток. Данная особенность имеет важную функциональную роль. Известно, что при фосфорилировании остатка серина (S) вариант H2A.X способен служить маркером двухцепочечных разрывов ДНК и тем самым привлекать машинерию, устраняющую повреждение ДНК [23].

Вариант H2A.Z представляет собой множество последовательностей, обладающих высокой консервативностью между собой (идентичность последовательностей более 72%). При этом анализ выравниваний аминокислотных последовательностей варианта H2A.Z у хордовых позволил выделить две группы белков, которые отличаются всего тремя аминокислотными остатками (данные не представлены). Несмотря на столь незначительные вариации, они кодируются разными генами. Кроме того, некоторые исследования свидетельствуют о том, что данные группы могут быть функционально независимыми. Например, белки варианта H2A.Z, попавшие в одну из групп, кодируются геном, который гомологичен человеческому H2AZ1, а также лучше взаимодействует с белком, содержащим бромодомен BRD2 [24]. Для белков другой группы, кодируемых геном, гомологичным человеческому H2AZ2, было обнаружено, что они предпочтитель-

но связываются с гистонем семейства H3, триметилированным по лизину 4 (H3K4me3) [21].

Самым длинным гистоновым вариантом является macroH2A (в среднем 360 аминокислотных остатков). Такая длина объясняется наличием негистонического макродомена, который соединен с C-концом центральной области глобулярного домена. Аминокислотные последовательности варианта macroH2A демонстрируют высокий уровень консервативности между собой (более 64% идентичности по всей длине). При этом область негистонического макродомена очень разнообразна, что может свидетельствовать о его структурной и функциональной значимости. Более того, на человеческих белках, которые кодируются генами MACRONH2A1 и MACRONH2A2, было показано, что некоторые из них способны связывать производные метаболиты НАД⁺, такие как АДФ-рибоза и поли-АДФ-рибоза, с помощью макродоменов [4].

Аминокислотные последовательности варианта H2A.W, обнаруженного исключительно в растениях, являются представителями одного из самых консервативных вариантов семейства H2A (более 76% идентичности). Наиболее разнообразные вариации встречаются в областях, расположенных между альфа-спиралями. Вариант H2A.W также может быть охарактеризован наличием специфического мотива SPKK, расположенного в C-концевом хвосте. Исходя из литературных данных, можно предположить, что данный мотив играет важную роль в структуре хроматина, так как он может связываться с малой бороздкой ДНК [12].

Отдельного внимания заслуживают «короткие» гистоны семейства H2A, которые преимущественно экспрессируются во время развития мужских половых клеток млекопитающих [19]. Недавно было обнаружено, что они обладают рядом особенностей, схожими с мутациями онкогистонов, которые могут приводить к дестабилизации нуклеосом [20]. Кроме того, что «короткие» H2A обладают самой низкой консервативностью (рис. 3), у них обнаружены значимые вариации в аминокислотных последовательностях. Например, все варианты «коротких» H2A имеют укороченные C-концевой хвост и структурный домен «docking domain», характерный для всех белков семейства H2A. При этом H2A.Q имеет наиболее короткий хвост (рис. 3). Важно отметить, что в аминокислотных последовательностях гистонов группы «коротких» H2A имеются вариации в сайтах связывания с ДНК и в регионе «acidic patch», который отвечает за стабильность хроматина [22]. Например, у варианта H2A.P отсутствуют оба аргинина, участвующие в связи с малой бороздкой ДНК, а также четыре из шести остатков «acidic patch», причем один из них заменен на положительно заряженную аминокислоту – аргинин. Вариант H2A.L лишен всего лишь трех остатков из региона «acidic patch». В аминокислотных после-

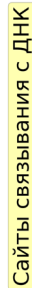


Рис. 3. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей «коротких» гистонов семейства H2A. **А.** Полное выравнивание в области гистоновых фолдов, отмеченных на панели «А» рамкой светло-синего цвета. Выравнивание построено для консенсусных последовательностей отдельных кластеров, полученных в ходе множественных выравниваний и кластерного анализа «коротких» гистоновых вариантов H2A. Темно-синими прямоугольными рамками выделены аминокислоты «acidic patch» и сайты связывания с ДНК (характерной чертой всех гистонов семейства H2A является наличие аргинина в сайтах связывания с ДНК). Синим цветом закрашены аминокислотные остатки, закрашенные положительно. Красным цветом закрашены аминокислотные остатки, зараженные отрицательно.

довательностях H2A.В обнаружены всего два из шести остатков «acidic patch» и один из аргининов — в сайте связывания с ДНК. Интересно отметить, что наблюдаются отличия между двумя кластерами последовательностей в группе гистоновых вариантов H2A.В, которые были получены в ходе кластерного анализа «коротких» гистонов семейства H2A. Например, можно выделить две позиции, находящиеся в регионе «acidic patch». В одной из них оказалась положительно заряженная аминокислота в обоих кластерах H2A.В (E127K и E127R), в другой — только в одном из кластеров (E159R). Аминокислотные последовательности недавно обнаруженного H2A.Q также имеют различия между выявленными кластерами [6]. В одном из них отсутствуют все кислотные остатки в регионе «acidic patch» (причем в трех позициях встречаются положительно заряженные аминокислоты: E122K, E130K, E158K) и все аргинины в сайтах связывания с ДНК. В двух других кластерах последовательностей у варианта H2A.Q можно увидеть только один из шести остатков «acidic patch».

Заключение

В результате анализа разнообразия гистоновых белков семейства H2A мы показали, что гистоны семейства H2A обладают значительным разнообразием первичных последовательностей. Охарактеризованные нами различия, которые встречаются

у гистоновых вариантов H2A, влияют на структурные, физико-химические и функциональные свойства гистонов и нуклеосом. Проведенный в нашей работе анализ также показал, что каждое отдельное подсемейство обладает специфичным набором характеристик, некоторые из которых находятся в участках взаимодействия с другими гистонами и ДНК, что может оказывать влияние на стабильность нуклеосомы. При этом важную роль в динамике хроматина могут играть не только значительные отличия (например, наличие доменов или мотивов), но и отдельные небольшие вариации в аминокислотных последовательностях (например, вариации, расположенные в «acidic patch»). Проведенный в данной работе анализ группы «коротких» гистонов H2A, продемонстрировал, что некоторые последовательности вариантов подсемейства (H2A.В, H2A.Р, H2A.Q, H2A.L) образуют отдельные клады на филогенетическом дереве, возникшие, вероятно, в ходе различных эволюционных событий и обладающие характерными отличиями между первичными последовательностями.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования № 075-15-2021-1062. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Talbert P.B., Henikoff S. Histone variants at a glance. *J. Cell Sci.* 2021;134(6):jcs244749.
2. Draizen E.J., Shaytan A.K., Mariño-Ramírez L., Talbert P.B., Landsman D., Panchenko A.R. HistoneDB 2.0: a histone database with variants—an integrated resource to explore histones and their variants. *Database.* 2016;2016:baw014.
3. Malik H.S., Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2003;10(11):882–891.
4. Kustatscher G., Hothorn M., Pugieux C., Schefzek K., Ladurner A.G. Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005;12(7):624–625.
5. Yelagandula R., Stroud H., Holec S., Zhou K., Feng S., Zhong X., Muthurajan M., Nie X., Kawashima T., Groth M., Luger K., Jacobsen S., Berger F. The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in *Arabidopsis*. *Cell.* 2014;158(1):98–109.
6. Tanaka M., Hennebold J.D., Macfarlane J., Adashi E.Y. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development.* 2001;128(5):655–664.
7. Jiang D., Borg M., Lorković Z.J., Montgomery S.A., Osakabe A., Yelagandula R., Axelsson E., Berger F. The evolution and functional divergence of the histone H2B family in plants. *PLOS Genetics.* 2020;16(7):e1008964.
8. Strickland M., Strickland W.N., Brandt W.F., Von Holt C., Wittmann-Liebold B. The complete amino-acid sequence of histone H2B(3) from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. *Eur. J. Biochem.* 1978;89(2):443–452.
9. Kawashima T., Lorković Z.J., Nishihama R., Ishizaki K., Axelsson E., Yelagandula R., Yelagandula R., Kohchi T., Berger F. Diversification of histone H2A variants during plant evolution. *Trends Plant Sci.* 2015;20(7):419–425.
10. Ueda K., Suzuki M., Ono M., Ide N., Tanaka I., Inoue M. Male gametic cell-specific histone gH2A gene of *Lilium longiflorum*: genomic structure and promoter activity in the generative cell. *Plant Mol. Biol.* 2005;59(2):229–238.
11. Molaro A., Young J.M., Malik H.S. Evolutionary origins and diversification of testis-specific short histone H2A variants in mammals. *Genome Res.* 2018;28(4):460–473.
12. Churchill M.E., Suzuki M. “SPKK” motifs prefer to bind to DNA at A/T-rich sites. *EMBO J.* 1989;8(13):4189–4195.
13. Zambrano-Mila M.S., Aldaz-Villao M.J., Casas-Mollano J.A. Canonical histones and their variants in plants: evolution and functions. *Epigenetics in plants of agronomic importance: fundamentals and applications*. Eds. R. Alvarez-Venegas, C. De-la-Peña, J. Casas-Mollano. Cham: Springer; 2019:185–222.
14. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947–2948.
15. Wheeler T.J., Kececioglu J.D. Multiple alignment by aligning alignments. *Bioinformatics.* 2007;23(13):i559–i568.
16. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–1797.

17. Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 2010;59(3):307–321.

18. Beitz E. TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics.* 2000;16(2):135–139.

19. Jiang X., Soboleva T.A., Tremethick D.J. Short histone H2A variants: small in stature but not in function. *Cells.* 2020;9(4):867.

20. Chew G.L., Bleakley M., Bradley R.K., Malik H.S., Henikoff S., Molaro A., Sarthy J. Short H2A histone variants are expressed in cancer. *Nat. Commun.* 2021;12(1):490.

21. Dryhurst D., Ishibashi T., Rose K.L., Eirín-López J.M., McDonald D., Silva-Moreno B., Veldhoen N., Helbing C.C., Hendzel M.J., Shabanowitz J., Hunt D.F.,

Ausió, J. Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates. *BMC Biology.* 2009;7(1):86.

22. Shaytan A.K., Landsman D., Panchenko A.R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015;32:48–57.

23. Millar C.B. Organizing the genome with H2A histone variants. *Biochem. J.* 2013;449(3):567–579.

24. Draker R., Ng M.K., Sarcinella E., Ignatchenko V., Kislinger T., Cheung P. A Combination of H2A.Z and H4 acetylation recruits Brd2 to chromatin during transcriptional activation. *PLoS Genetics.* 2012;8(11):e1003047.

Поступила в редакцию 18.07.2023

После доработки 17.11.2023

Принята в печать 26.11.2023

RESEARCH ARTICLE

Diversity of H2A histones and their implications for nucleosome structural properties

L. Singh-Palchevskaia , A.K. Shaytan* 

¹*Institute of Bioengineering, Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1-12, Moscow, 119234, Russia*

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

Histone proteins are key epigenetic factors, which play an important role in chromatin dynamics and gene activity regulation. They are divided into two broad classes: canonical histones and their variants. Canonical histones are expressed mainly during the S-phase of the cell cycle, as they are involved in DNA packaging during cell division. Histone variants are histone genes that are expressed and regulate chromatin dynamics throughout the cell cycle. Due to the functional and species diversity, various families of histone variants are distinguished. Some proteins may differ slightly from canonical histones, while others, on the contrary, may have many important structural and functional features that affect nucleosome stability and chromatin dynamics. In order to assess the variability of the H2A histone family and their role in nucleosome structure, we performed a bioinformatic analysis of the amino acid sequences of the H2A histone family. The clustering performed by the UPGMA method made it possible to reveal two main subfamilies of H2A proteins: short H2A and other H2A variants demonstrating highly conserved amino acid sequences. We also constructed and analyzed multiple alignments for various H2A histone subfamilies. It is important to note that the proteins of the short H2A subfamily are not only the least conserved within the H2A family, but also have features that significantly affect the structural properties of the nucleosome. In addition, we performed a phylogenetic analysis of short H2A, which resulted in the identification and characterization of individual clades on the phylogenetic tree for the variants H2A.B, H2A.P, H2A.Q, H2A.L.

Keywords: *histone, H2A, histone variants, nucleosome, chromatin, sequence analysis, bioinformatics, epigenetics*

Funding: The research was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education grant No. 075-15-2021-1062.

Сведения об авторах

Сингх-Пальчевская Лаврит — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: l.singh@intbio.org; ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-1351-6675>

Шайтан Алексей Константинович — докт. физ.-мат. наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0312-938X>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 571.27

Участие митоген-активируемых протеинкиназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек

Н.В. Воробьева*

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

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Нейтрофилы высвобождают деконденсированный ядерный хроматин или нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, Neutrophil Extracellular Trap) в ответ на большое количество разнообразных физиологических стимулов с целью защиты хозяина от патогенов. Однако как было недавно установлено, NET играют также важную роль в патогенезе аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний. В этой связи понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе образования NET и ведущих, как правило, к гибели нейтрофилов (NETоз), крайне важно для обеспечения контроля за aberrантным выбросом хроматина. Митоген-активируемые протеинкиназы (МАР-киназы) участвуют в разнообразных функциях клеток, таких как окислительный взрыв, хемотаксис, дегрануляция, адгезия и апоптоз, однако их роль в NETозе исследовалась недостаточно. У нейтрофилов человека описаны три семейства МАР-киназ – p38, ERK1/2 и JNK. В нашей работе было исследовано участие p38, ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в окислительном взрыве и NETозе с использованием ингибиторного анализа. Мы показали, что МАР-киназа p38 и протеинкиназа B Akt1/2 активируются при стимуляции окислительного взрыва и NETоза кальциевым ионофором иономицином. Вместе с тем эти киназы не принимают участия в окислительном взрыве, индуцированном миметиком диацилглицерола форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА), но участвуют в ФМА-индуцированном NETозе.

Ключевые слова: нейтрофилы человека, окислительный взрыв, нейтрофильные внеклеточные ловушки, митоген-активируемые протеинкиназы, протеинкиназа B, НАДФН-оксидаза

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

Нейтрофилы представляют собой наиболее многочисленную группу лейкоцитов крови человека, обеспечивающих первую линию защиты хозяина от патогенов. Являясь профессиональными фагоцитами, нейтрофилы содержат антимикробные ферменты в гранулах и выполняют такие эффекторные функции, как фагоцитоз, дегрануляция и образование активных форм кислорода (АФК) в очагах воспаления. Новой эффекторной функцией нейтрофилов, впервые исследованной в лаборатории Артуро Циклински [1], является образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET, Neutrophil Extracellular Trap). NET состоят из деконденсированного хроматина, покрытого гистонами, антимикробными ферментами и катионными пептидами гранул, а также цитозольными белками. Процесс образования NET, ведущий к программируемой гибели клеток, был назван NETозом [2].

Впоследствии оказалось, что, помимо защитной функции, NET играют важную роль в патогенезе таких аутоиммунных и воспалительных заболеваний, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, васкулит мелких сосудов и псориаз [3–8]. В связи с этим расшифровка сигнальных путей, ведущих к выбросу NET, крайне важна для обеспечения контроля их нерегулируемого или избыточного образования.

Образование NET может быть индуцировано большим количеством разнообразных физиологических стимулов, таких как бактерии, грибы, простейшие, вирусы и продукты клеточной стенки бактерий (липополисахариды) [1]. NET также могут быть индуцированы антителами и иммунными комплексами [9–10], цитокинами и хемокинами (IL-8, TNF- α , IFN- γ) [11], кальциевыми [12–14] и калиевыми [15] ионофорами, а также фармакологическими стимулами – например, форбол-

12-миристан-13-ацетатом (ФМА) [12–14]. За последние несколько лет появились сообщения о стимуляции NETоза электромагнитным излучением [16–17].

Классический, или «суицидальный», NETоз представляет собой многостадийный процесс, включающий образование АФК ферментным комплексом НАДФН-оксидазой, диссоциацию под действием пероксида водорода «азуром» — белковых комплексов, расположенных в мембранах азурофильных гранул [18], выход из азуром сериновых протеаз и миелопероксидазы (МПО) в цитоплазму, их последующую миграцию в ядро, где вместе с пептидиларгининдеиминазой 4, цитруллинирующей гистоны, они обеспечивают деконденсацию ядерного хроматина [1]. Итогом перечисленных реакций является выброс хроматина из клетки, или NETоз.

Помимо упомянутых выше ключевых ферментов NETоза в сигнальных путях передачи информации от первичного акцептора сигнала и до образования NET принимает участие большое количество ферментов — например, изоформы протеинкиназы С (PKC, protein kinase C) [14, 19], циклинзависимые киназы 4/6 [20], Raf-MEK-ERK-сигнальный ферментативный каскад [21], нерецепторные тирозинкиназы Src-семейства [22], митоген-активируемые протеинкиназы (MAP-киназы) [21, 23, 24] и протеинкиназа B Akt1/2 [25].

В настоящее время у млекопитающих описаны пять основных семейств MAP-киназ: регулируемые внеклеточными сигналами киназы 1 и 2 (ERK1/2), активируемые стрессом протеинкиназы SAPK/JNK, протеинкиназы p38, ERK3 и ERK5, причем в нейтрофилах человека были обнаружены первые три семейства MAP-киназ. Было показано, что MAP-киназы p38 и ERK1/2 активируются в течение нескольких секунд в ответ на широкий спектр стимулов, включающий бактериальные пептиды, цитокины, липополисахариды и хемотактанты [26]. Участие MAP-киназ p38 и ERK1/2 было подробно изучено в таких регуляторных процессах, как окислительный взрыв, хемотаксис, дегрануляция, адгезия и апоптоз [26], однако их роль в NETозе исследовалась в ограниченном количестве работ [21, 23, 24] и полученные данные носят противоречивый характер.

С использованием ингибиторного анализа было показано [24], что активатор протеинкиназы C, ФМА, стимулирует образование NET с участием p38 и ERK1/2. Однако ингибиторы этих MAP-киназ не подавляли ФМА-стимулированный окислительный взрыв. Это позволило авторам сделать вывод, что экспрессия MAP-киназ p38 и ERK1/2 в NETотическом сигнальном пути происходит после стимуляции НАДФН-оксидазы и регулируется оксидаза-зависимыми АФК. Напротив, Хакким и соавт. [21] обнаружили, что ин-

гибитор киназы ERK1/2 подавляет как окислительный взрыв, так и NETоз, стимулированный ФМА. По мнению авторов, ERK1/2 находится в сигнальном пути образования NET до НАДФН-оксидазы. Участие MAP-киназ в NETозе, индуцированном кальциевыми ионофорами, исследовалось только на линии нейтрофилоподобных клеток человека HL-60 [23]. Целью настоящей работы было изучение роли MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в окислительном взрыве и NETозе полученных от здоровых доноров нейтрофилов, стимулированных ФМА и кальциевым ионофором иономицином.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, иономицин, SB202190 (ингибитор p38), FR180204 (ингибитор ERK1/2), ингибитор киназы Akt1/2 VIII, диметилсульфоксид и люминол были приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). Краситель SYBR Green и смола ProLong Gold были закуплены в Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, США).

Выделение первичных нейтрофилов человека. Все исследования с кровью проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Образцы крови были получены с добровольного согласия доноров в отделении переливания крови Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. Периферическую кровь здоровых доноров забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином. Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Huраque (плотность 1,077 г/см³) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре, как описано ранее [12]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстрате. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2%-ный NaCl) в течение 30 с и далее восстанавливали изотоничность путем добавления 1,6%-ного NaCl. Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде (PKC), включающей RPMI1640, 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин и 1%-ную инактивированную эмбриональную телячью сыворотку. Полученные клетки были представлены на 97% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла не менее 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). ЛЗХЛ использовали для оценки суммарных АФК, как описано ранее [12, 13]. Свежевыделенные нейтрофилы в концентрации ($2,5 \times 10^6$ клеток/мл) инкубировали в присутствии ингибиторов MAP-киназ SB202190 и FR180204,

а также ингибитора Akt1/2 в возрастающих концентрациях в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂ в ПКС. Далее ПКС заменяли на фосфатный буфер Кребса-Рингера (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,7 mM KH₂PO₄, 8,3 mM Na₂HPO₄, 10 mM глюкоза, 1 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, pH 7,3). К 2 × 10⁵ клеток добавляли люминол (конечная концентрация 80 мкМ) и проводили стимуляцию окислительного взрыва в присутствии 2,5 мкМ иономицина или 30 нМ ФМА. ЛЗХЛ анализировали сразу после стимуляции в течение 30 мин при 37° С в планшетном хемилюминиметре Lucy 1 (Anthos Labtec, Австрия). Оценивали площадь, занимаемую кривыми ЛЗХЛ, и выражали степень окислительного взрыва в процентах от контроля (контроль: стимулированные нейтрофилы, 100%) в виде гистограмм.

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET.

Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Свежевыделенные нейтрофилы (2 × 10⁵ клеток/мл в 500 мкл ПКС), адгезированные на круглых покровных стеклах, находящихся в лунках 24-луночного планшета, инкубировали с SB202190, FR180204 и ингибитором Akt1/2 в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂. Образование NET индуцировали 30 нМ ФМА или 2,5 мкМ иономицина в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. После стимуляции NETоза клетки фиксировали в лунках в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин. Препараты окрашивали SYBR Green в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте, далее погружали в смолу ProLong Gold. Клетки анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия), а фотографирование проводили с помощью камеры Leica DC300F. Подсчитывали общее количе-

ство клеток и количество NETотических клеток в каждом поле зрения, затем оценивали процент NETоза в нескольких полях зрения.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США). Сравнение между несколькими экспериментальными группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони. Данные в тексте и на рисунках представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего пяти независимых экспериментов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Чтобы выяснить, зависит ли окислительный взрыв нейтрофилов здоровых доноров, активированный ФМА и кальциевым ионофором иономицином, от MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2, были применены их специфические ингибиторы: SB202190 (ингибитор p38), FR180204 (ингибитор ERK1/2) и ингибитор Akt1/2 (VIII). Окислительный взрыв оценивали с помощью регистрации ЛЗХЛ, как описано в разделе «Материалы и методы».

На рис. 1А можно видеть, что инкубация нейтрофилов с ингибиторами трех киназ в возрастающих концентрациях не приводила к значимому подавлению окислительного взрыва, индуцированного ФМА. Однако ингибиторы p38 и Akt1/2 эффективно и дозозависимым способом подавляли окислительный взрыв, индуцированный иономицином (рис. 1Б), в то время как ингибитор ERK1/2 был неэффективен.

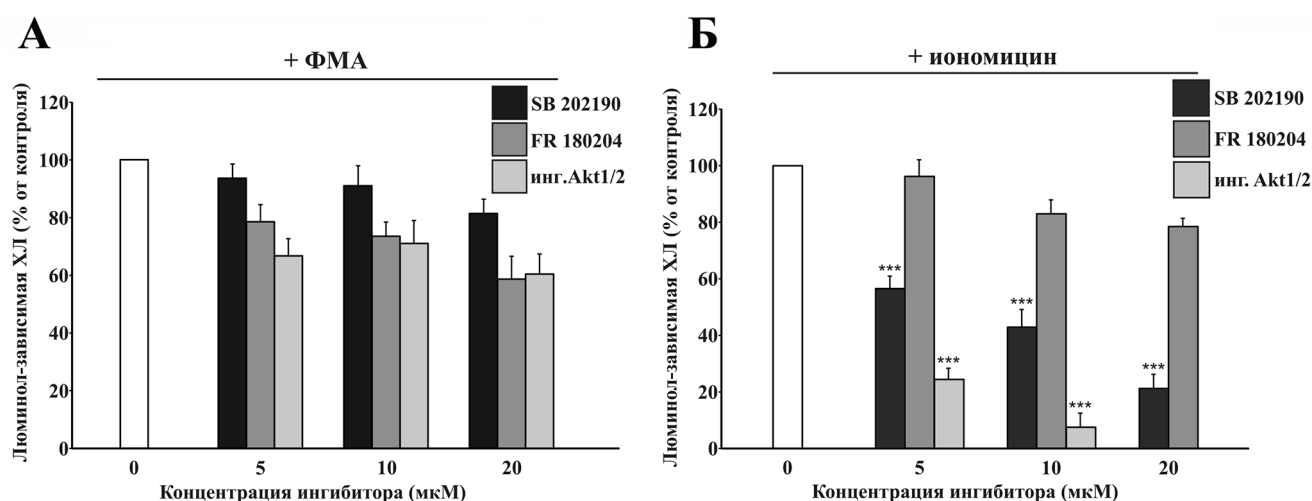


Рис. 1. Оценка участия MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в окислительном взрыве нейтрофилов человека, стимулированном ФМА и иономицином. Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии ингибиторов MAP-киназ p38 (SB202190) и ERK1/2 (FR180204), а также ингибитора протеинкиназы B Akt1/2 в возрастающих концентрациях в течение 30 мин. Окислительный взрыв индуцировали ФМА (30 нМ) (А) или иономицином (2,5 мкМ) (Б), и регистрировали хемилюминесценцию в присутствии люминола (80 мкМ). $n = 5$. *** – $p < 0,001$. Сокращения на графиках: ХЛ, хемилюминесценция; инг. Akt1/2, ингибитор киназы Akt1/2 VIII.

Для оценки участия MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы В Akt1/2 в NETозе, индуцированном ФМА и иономицином, нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии соответствующих ингибиторов киназ в возрастающих концентрациях. На рис. 2 (А, В) можно видеть, что все три ингибитора подавляли ФМА-индуцированный NETоз дозозависимым способом. Однако в случае иономицин-индуцированного NETоза, только ингибиторы p38 и Akt1/2 эффективно подавляли образование NET (рис. 2 Б, Г), тогда как ингибитор ERK1/2 такого действия не оказывал. Эти данные коррелируют с действием ингибиторов киназ на иономицин-индуцированный окислительный взрыв.

Таким образом, в нашем исследовании с применением ингибиторного анализа показано, что MAP-киназы p38 и ERK1/2, а также протеинкиназа В Akt1/2 участвуют в NETозе, но не окислительном взрыве, активированном ФМА (рис. 3А). Полученные данные коррелируют с результатами работы

Кешари и соавт. [24], в которой также утверждается, что киназы p38 и ERK1/2 расположены в сигнальном NETотическом пути после НАДФН-оксидазы и активируется при участии оксидаза-зависимых АФК. Однако Хакким и соавт. [21] показали, что ингибитор киназы ERK1/2 (UO126) подавляет как окислительный взрыв, так и NETоз, что не согласуется с нашими результатами и данными Кешари и соавт. Авторы утверждают [21], что киназа ERK1/2 находится в сигнальном пути активации NETоза до НАДФН-оксидазы, а ее подавление ингибирует образование оксидаза-зависимых АФК и, соответственно, NETоза.

Хотя в нашей работе не было продемонстрировано подавление ФМА-стимулированного окислительного взрыва ингибиторами MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы В Akt1/2, мы полагаем, что эти киназы участвуют в стимуляции НАДФН-оксидазы, а их эффект не виден из-за мощной активации РКС ФМА. Однако для доказательства участия этих киназ в окислительном

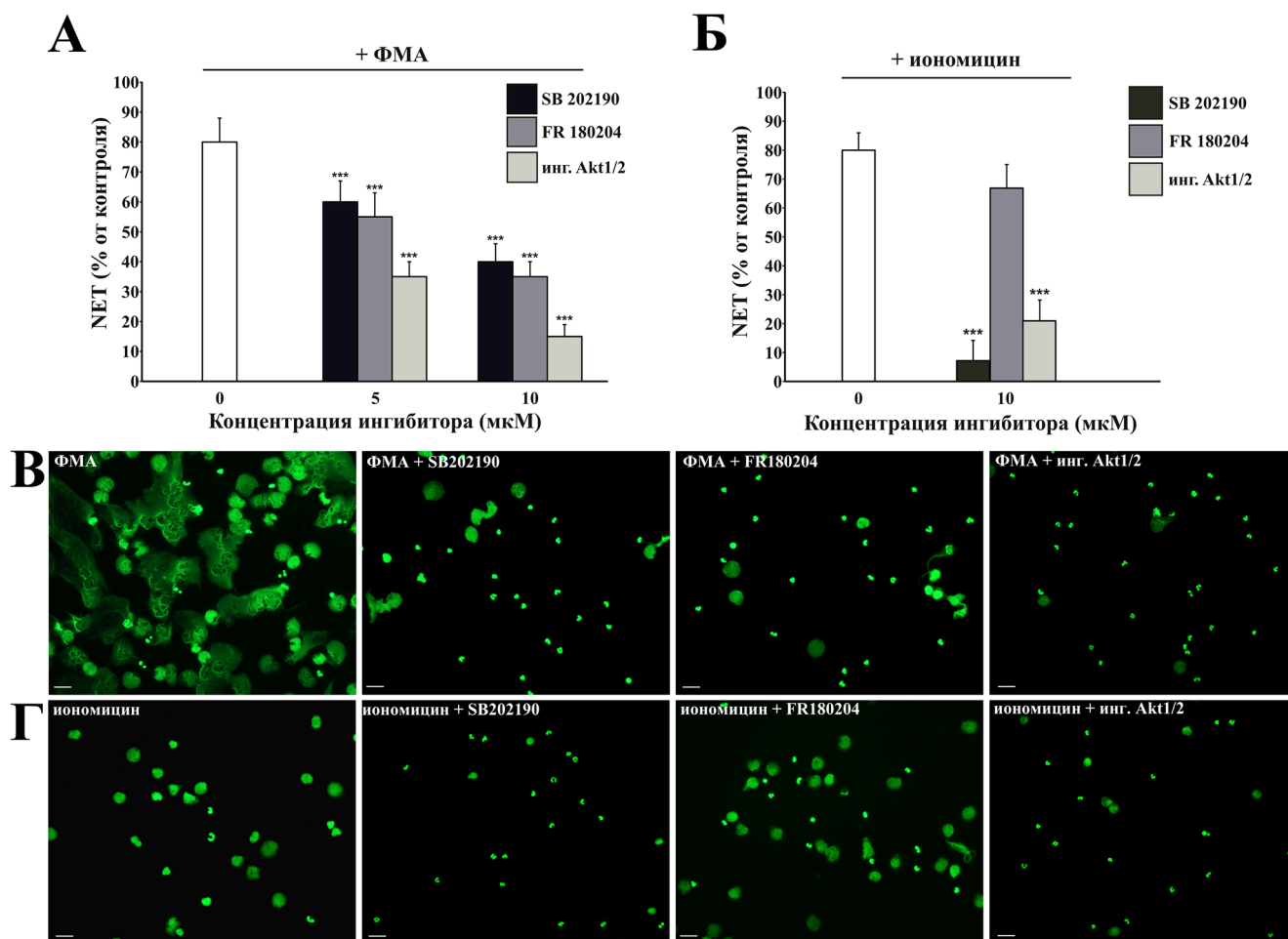


Рис. 2. Оценка участия MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы В Akt1/2 в NETозе, стимулированном ФМА и иономицином. Для оценки NETоза нейтрофилы здоровых доноров, адгезированные на круглых покровных стеклах, инкубировали в присутствии ингибиторов MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также киназы Akt1/2 в возрастающих концентрациях в течение 30 мин. NETоз индуцировали ФМА (30 нМ) (А, В) или иономицином (2,5 мкМ) (Б, Г) в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. Клетки фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида и окрашивали SYBR Green для визуализации хроматина. $n = 5$. *** — $p < 0,001$. Концентрации ингибиторов p38, ERK1/2 и Akt1/2 составляют 10 мкМ (Б, Г). Масштаб 25 мкм.

Сокращения на графиках: инг. Akt1/2, ингибитор киназы Akt1/2 VIII; NET, нейтрофильные внеклеточные ловушки (от Neutrophil Extracellular Trap).

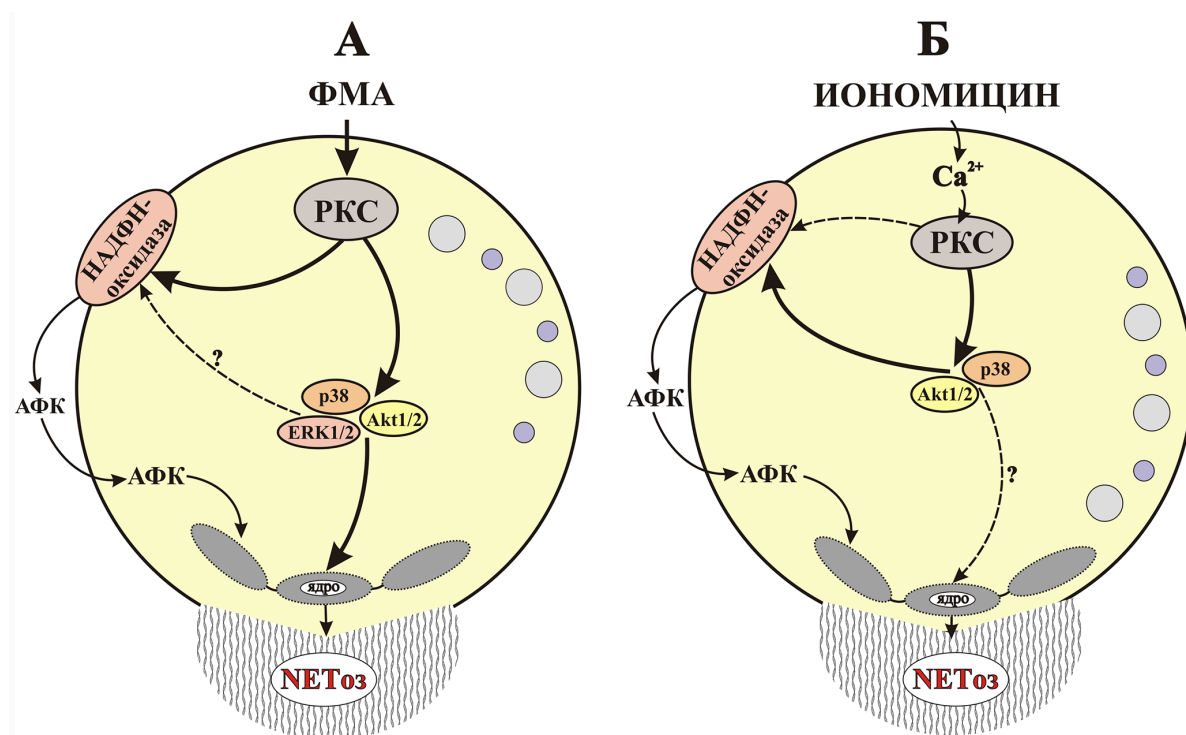


Рис. 3. Схема активации NETоза под действием различных стимулов.

Сокращения: PKC, протеинкиназа C; АФК, активные формы кислорода; ФМА, форбол-12-миристан-13-ацетат; p38, ERK1/2, митоген-активируемые протеинкиназы; Akt1/2, протеинкиназа B.

взрыве может потребоваться использование ингибиторов в более высоких концентрациях. В то же время известно, что ингибиторы этих киназ в дозах выше 20 мкМ могут вызывать неспецифические эффекты. Интересно, что Хакким и соавт. [21] использовали в своей работе ингибитор ERK1/2 в достаточно высокой концентрации – 100 мкМ.

В отличие от ФМА, ионофор кальция иономицин действует более специфично, вызывая высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула, что активирует PKC и далее p38 и Akt1/2 (рис. 3Б). Подавление этих киназ соответствующими ингибиторами в нашей работе приводило к уменьшению как окислительного взрыва, так и NETоза. Таким образом, МАР-киназа p38 и протеинкиназа B Akt1/2 участвуют в иономицин-индуцированном окислительном взрыве,

влияя на эффективность NETоза. Однако эти киназы также могут быть непосредственно вовлечены в NETоз, что еще предстоит выяснить в наших дальнейших исследованиях.

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121042600047-9 и Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Исследование было одобрено локальным комитетом по этике Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (протокол № 2э/9-19 от 2 апреля 2019 г.). Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–1535.
2. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE*. 2007;2007(379):e11.
3. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2015;14(7):633–640.
4. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014;79(12):1286–1296.
5. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(10):1178–1190.
6. Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020;75(4):173–188.
7. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18(2):134–147.

8. Свистушкин В.М., Никифорова Г.Н., Воробьева Н.В., Деханов А.С., Дагиль Ю.А., Бредова О.Ю., Еремеева К.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в патогенезе хронического риносинусита. *Вестн. оторинол.* 2021;86(6):105–112.
9. Chen K., Nishi H., Travers R., Tsuboi N., Martinod K., Wagner D.D., Stan R., Croce K., Mayadas T.N. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA *in vivo*. *Blood*. 2012;120(22):4421–4431.
10. Behnen M., Leschczyk C., Möller S., Batel T., Klinger M., Solbach W., Laskay T. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J. Immunol.* 2014;193(4):1954–1965.
11. Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J., Barthwal M.K., Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012;7(10):e48111.
12. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*. *Eur. J. Cell. Biol.* 2017;96(3):254–265.
13. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshchev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020;1866(5):165664.
14. Vorobjeva N., Dagil Y., Pashenkov M., Pinegin B., Chernyak B. Protein kinase C isoforms mediate the formation of neutrophil extracellular traps. *Int. Immunopharmacol.* 2022;24(114): 109448.
15. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., Brinkmann V., Bernuth H.V., Zychlinsky A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*. 2017;6:e24437.
16. Neubert E., Bach K.M., Busse J., Bogeski I., Schön M.P., Kruss S., Erpenbeck L. Blue and Long-Wave Ultraviolet Light Induce *in vitro* Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *Front. Immunol.* 2019;10:2428.
17. Arzumanyan G., Mamatkulov K., Arynbeke Y., Zakrytnaya D., Jevremović A., Vorobjeva N. Radiation from UV-A to red light induces ROS-dependent release of neutrophil extracellular traps. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(6):5770.
18. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell. Rep.* 2014;8(3):883–896.
19. Vorobjeva N.V., Vakhlyarskaya S.S., Chernyak B.V. The role of protein kinase C isoforms in the formation of neutrophil extracellular traps. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(2):112–121.
20. Amulic B., Knackstedt S.L., Abu Abed U., Deigendesch N., Harbort C.J., Caffrey B.E., Brinkmann V., Heppner F.L., Hinds P.W., Zychlinsky A. Cell-cycle proteins control production of neutrophil extracellular traps. *Dev. Cell.* 2017;43(4):449–462.e5.
21. Hakkim A., Fuchs T.A., Martinez N.E., Hess S., Prinz H., Zychlinsky A., Waldmann H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 2011;7(2):75–77.
22. Vorobjeva N.V. Participation of non-receptor Src-family tyrosine kinases in the formation of neutrophil extracellular traps. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023;78(1):8–13.
23. Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112(9):2817–2822.
24. Keshari R.S., Verma A., Barthwal M.K., Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J. Cell. Biochem.* 2013;114(3):532–540.
25. Douda D.N., Yip L., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. *Blood*. 2014;123(4):597–600.
26. Ono K., Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* 2000;12(1):1–13.

Поступила в редакцию 08.09.2023

После доработки 10.11.2023

Принята в печать 11.12.2023

RESEARCH ARTICLE

Involvement of mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 as well as protein kinase B Akt1/2 in the formation of neutrophil extracellular traps

N.V. Vorobjeva* 

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

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Neutrophils release decondensed nuclear chromatin or Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in response to a great number of physiological stimuli to protect the host from pathogens. However, NETs have recently been shown to play an important role in the pathogenesis of autoimmune, inflammatory, and malignant diseases. Therefore, understanding the molecular

mechanisms underlying NETs formation, usually leading to the neutrophil death (NETosis), is extremely important to control the aberrant release of chromatin. Mitogen-activated protein kinases (MAP-kinases) are involved in various cellular functions such as oxidative burst, chemotaxis, degranulation, adhesion, and apoptosis, but their role in NETosis is not well understood. Three families of MAP-kinases, p38, ERK1/2, and JNK, have been described in human neutrophils, and we investigated the contribution of p38, ERK1/2, and protein kinase B Akt1/2 in oxidative burst and NETosis using inhibitory analysis. We have shown that MAP-kinase p38 as well as protein kinase B Akt1/2 are activated upon stimulation of oxidative burst and NETosis with calcium ionophore ionomycin. However, these kinases are not involved in the oxidative burst induced by diacylglycerol mimetic phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) but are involved in PMA-induced NETosis.

Keywords: *human neutrophils, oxidative burst, neutrophil extracellular traps, mitogen-activated protein kinases, protein kinase B, NADPH oxidase*

Funding: The research was carried out within the framework of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No 121042600047-9 and Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology.”

Сведения об авторе

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.152.34:582.282.123.4

Кератинолитический потенциал микромицета *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 и сравнение его ферментов с коммерческим препаратом кератиназы

С.Н. Тиморшина¹ , Е.А. Попова¹ , К.И. Кулешова¹,
А.К. Акьол^{1, 2}, А.А. Осмоловский^{1, *}

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

²Faculty of Science, Bursa Uludag University, Turkey, 16059 Nilüfer, Bursa, Görükle Kampüsü

*e-mail: aosmol@mail.ru

Кератинсодержащие отходы (перья, щетина) составляют большую часть всех отходов животноводства — быстроразвивающейся отрасли сельского хозяйства, увеличивающей объем продукции ежегодно. Развитие методов экологически чистой переработки таких отходов с получением ценных ресурсов (аминокислот и олигопептидов) — важная задача современной науки, в том числе биотехнологии. Одним из путей утилизации отходов животноводства, отвечающим современным тенденциям развития зеленой экономики, является использование микроорганизмов и их ферментов. Была изучена возможность получения кератинолитических ферментов *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 в глубинных условиях с различными источниками азота и углерода, в том числе при росте продуцента на отходах животноводства. Наибольшая целевая активность (96,1 Е) достигалась при использовании смешанных источников углерода и азота: неорганического — нитрата натрия, легкоусвояемого органического — гидролизата рыбной муки и труднодоступного органического — перемолотого куриного пера. Варьирование содержания различных субстратов в составе ферментационных сред позволило не только регулировать уровень протеолитической активности, но и достигать пика активности продуцента на разные сутки культивирования. Проведено сравнение удельной активности кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 (рИ 9,3) по отношению к различным белковым субстратам с активностью коммерческого препарата протеиназы К. Оба фермента показали схожий уровень активности по отношению к большинству использованных субстратов. Однако протеаза *A. clavatus* ВКПМ F-1593, как оказалось, обладает большей общей протеолитической активностью, что подтверждает перспективность этой культуры для биodeградации отходов животноводства.

Ключевые слова: кератиназы, кератинолитические ферменты, кератин, *Aspergillus clavatus*, протеиназа К, биodeградация

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-5

С ростом населения Земли растет потребность человечества в продуктах сельского хозяйства, что неизбежно приводит к увеличению объемов отходов этой отрасли экономики, в том числе отходов животного происхождения — перьев, щетины. Так, например, в 2020 г. в мире было накоплено более 8 млн тонн лишь перьев, являющихся основным побочным продуктом птицеводства и более чем на 80% состоящих из кератина [1]. Отходы животноводства богаты трудноразлагаемыми фибриллярными белками, в связи с чем в настоящее время такие отходы утилизируют путем сжигания, кислотного/щелочного гидролиза или захороне-

ния. Такие методы увеличивают негативное воздействие на окружающую среду за счет образования факторов загрязнения (например таких, как парниковые газы и сажа), способствуют распространению патогенных микроорганизмов, а также делают невозможным вторичное использование отходов животноводства [2].

Кератин — ценный источник аминокислот и олигопептидов, применение которых возможно в качестве удобрений, кормовых добавок, субстратов для производства биотоплива и биологически активных веществ. Однако получение этих соединений в свободном виде затруднено в связи

с устойчивостью кератина к широкому спектру протеаз, например, трипсина и папаина, что обусловлено его основными физиологическими функциями: структурной и защитной [3].

Для перехода к рациональному использованию трудноразлагаемых белковых субстратов необходимо развитие методов биodeградации. Современные подходы к гидролизу кератина основаны на применении протеолитических ферментов бактериального и грибного происхождения [4, 5]. В настоящее время существует обширная база сведений о бактериальных кератиназах и их продуцентах [6–10]. В том числе известно множество коммерческих кератинолитических препаратов на основе бактериальных протеаз [11, 12], однако проблема переработки кератинсодержащих отходов сельского хозяйства остается нерешенной.

Грибные кератиназы изучены меньше бактериальных. Единственным широко применимым препаратом на основе грибных ферментов с кератинолитической активностью до сих пор остается протеиназа К [13, 14]. Однако этот фермент не подходит для нужд биodeградации из-за своей дороговизны и патогенности продуцента. Микромицеты рода *Aspergillus* – перспективные продуценты протеаз широкого спектра, в том числе – гидролизующих фибриллярные белки [15, 16]. В 2022 г. Цю с соавт. были показаны наличие гена, кодирующего металлопротеазу AsMer с кератинолитической активностью в геноме *Aspergillus clavatus*, и возможность получения этого фермента в рекомбинантном штамме *Pichia pastoris* X-33 [17]. Затем, также в 2022 г., нами была показана секреция микромицетом *A. clavatus* ВКПМ F-1593 сериновой кератиназы при росте на куриных перьях [18]. Полученные данные говорят о перспективности этого штамма в качестве продуцента кератинолитических ферментов для биodeградации кератинсодержащих отходов сельского хозяйства.

Целью настоящей работы стала оптимизация наработки кератинолитических ферментов микро-

мицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 при росте продуцента на наиболее распространенных кератинсодержащих отходах животноводства (свиной щетине и куриных перьях), а также сравнение протеолитического потенциала кератиназ изучаемого штамма с таковым коммерческого аналога – протеиназы К.

Материалы и методы

Реактивы. Субстраты для анализа протеолитической активности, а также коммерческий препарат протеиназы К были приобретены у производителя Sigma-Aldrich (США). В исследовании были использованы соли, кислоты и другие реактивы фирмы Panreac (Испания). Куриные перья и свиная щетина были предоставлены частными малыми хозяйствами. Куриные перья перемалывали на промышленной роторной мельнице. Свиную щетину нарезали на фрагменты по 1,0–1,5 см.

Объект. Объектом исследования служил штамм *A. clavatus* ВКПМ F-1593 [19], относящийся к отделу Ascomycota. Поддержание культуры осуществляли на скошенном сусло-агаре при хранении в комнатных условиях (25°C).

Оптимизация получения кератинолитических ферментов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 при росте на отходах сельского хозяйства. Для оптимизации получения кератинолитических ферментов *A. clavatus* ВКПМ F-1593 выращивали в условиях глубинного культивирования. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера (750 мл) в 100 мл питательной среды на орбитальных качалках (200 об./мин) при 28°C. Для посева использовали споровую суспензию микромицета на 7-е сут роста на скошенном сусло-агаре. Культивирование проводили в две стадии. Сначала *A. clavatus* ВКПМ F-1593 выращивали на богатой питательными веществами посевной среде (сусло – 6,7, глюкоза – 2,0, пептон – 0,1, (%), pH 5,5), а на 2-е сут культивирования 3% биомассы от общего объема посевной среды переносили в одну из ферментационных сред, различающихся по источникам азота и углерода (табл. 1).

Таблица 1

Ферментационные среды для культивирования *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593

Компоненты	Ферментационные среды									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Количество, %									
K ₂ HPO ₄	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
MgSO ₄	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
KCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,05	0,05	0,05
FeSO ₄	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,001	0,001	0,001
глюкоза	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3,0	3,0	3,0
NaNO ₃	0,3	–	–	0,3	–	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
перемолотое куриное перо	–	0,5	–	0,5	0,25	–	0,25	0,5	–	0,25
измельченная свиная щетина	–	–	1	–	0,5	1	0,5	–	0,5	0,25
гидролизат рыбной муки	–	–	–	–	–	–	–	0,5	0,5	0,5

Культивирование в ферментационных средах проводили в течение 7 сут. Со 2 по 7 сут каждые 24 ч проводили отбор проб для фильтрации культуральной жидкости через бумажный фильтр. Затем культуральную жидкость использовали для измерения протеолитической активности.

Получение кератиназы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593. Получение ферментного препарата осуществляли путем двухстадийного глубинного культивирования с использованием ферментационной среды, при росте на которой продуцент проявил наибольшую протеолитическую активность. В день накопления максимальной протеолитической активности микромицетом белки осаждали сульфатом аммония из отфильтрованной от биомассы культуральной жидкости (608 г на 1 л культуральной жидкости). После 48 ч инкубации при 4°C белки центрифугировали при 3160 g и 4°C в течение 45 мин в центрифуге LMC-4200R (Biosan, Латвия). Осадки растворяли в 0,01 М Трис-НСl буфере (рН 8,2) и подвергали диализу против 0,005М Трис-НСl буфера (рН 8,2) в течение 24 ч перед повторным центрифугированием в аналогичных условиях. Супернатанты замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Полученные порошки препаратов внеклеточных белков хранили при температуре –20°C. Затем белки препарата разделяли методом изоэлектрофокусирования (по Вестербергу) в градиенте рН амфолинов 3,5–10,0 и плотности сахарозы 0–40% в колонке объемом 110 мл фирмы LKB (Швеция) при напряжении 800 В в течение 36 ч.

Анализ протеолитической активности. Кератинолитическую активность протеаз определяли спектрофотометрически с использованием 1%-ной суспензии кератина шерсти (ТС1, Япония) в 0,05М Трис-НСl буфере (рН 8,2).

Для проведения реакции к 100 мкл пробы добавляли 200 мкл суспензии кератина. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин в термошейкере при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), после чего в надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность при длине волны 280 нм.

Казеинолитическую активность внеклеточных протеаз микромицета определяли модифицированным методом Ансона–Хагихары, суть которого заключается в определении активности фермента как характеристики, пропорциональной количеству аминокислоты тирозина, входящей в состав олигопептидов, образующихся во время гидролиза казеина. Для проведения реакции к 100 мкл пробы добавляли 200 мкл 1%-ного раствора казеина по Хаммерштайну в 0,1М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Реакционную смесь инкубировали

при 37°C в течение 10 мин в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-ного раствора ТХУ. Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 275 нм [20].

Способность фермента расщеплять фибрин также оценивали по количеству высвобожденного тирозина. К 100 мкл пробы добавляли 200 мкл 1%-ной суспензии фибрина в 0,05М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-ной ТХУ, далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 275 нм [22].

Для определения коллагенолитической активности в культуральной жидкости использовали суспензию азоколлагена, приготовленного на 0,05М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Реакцию проводили с 200 мкл 0,2%-ного азоколлагена и 100 мкл пробы. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 20 мин в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-ного раствора ТХУ. Затем образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия) перед измерениями оптической плотности при 520 нм.

Для расширения представлений о субстратной специфичности кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 определяли протеолитическую активность с использованием растворов и суспензий в 0,05 М Трис-НСl буфере (рН 8,2) следующих окрашенных белков: азоказеин, эластин-конго красный, кератин-азур и Hide Powder Azure [21].

Условия проведения реакций представлены в табл. 2. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин. Реакцию останавливали добавлением 10%-ной ТХУ, далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), после чего измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости.

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед. в условиях проведения реакции.

Эксперименты проводились в трех повторностях, погрешность не превышала 5–7%. Данные были статистически обработаны с использованием MS Excel 2019 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовался U-критерий Манна-Уитни; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для оптимизации условий образования кератинолитических ферментов микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 была изучена динамика накопления протеолитической активности при росте продуцента на 10 средах с различными источниками азота (рис. 1, 2). Основными кератин-содержащими отходами сельского хозяйства являются перо и щетина, и они, предварительно очищенные и измельченные, были использованы в составе сред. Перо и щетина являются источником азота, углерода и серы для гриба, однако они относительно труднодоступны из-за особенностей структуры кератина. В связи с этим в среды также добавляли более доступные источники азота – нитрат и гидролизат рыбной муки (ГРМ), углерода – глюкоза, серы – сульфаты.

Максимальные значения кератинолитической активности (96,1 Е) были получены на среде с куриным пером и ГРМ на 6-е сут культивирования (рис. 1, 2), что подтверждает данные о перспективности использования этой среды для получения кератиназ [18].

Также умеренно высокие значения целевой активности были получены на средах со свиной щетиной; с пером, щетиной и нитратом, а также с нитратом и щетиной (рис. 1, 2). Пик кератинолитической активности на среде 3, содержащей только измельченную щетину в качестве источника азота, приходился на 6-е сут культивирования, а на средах 6 и 7 (со свиной щетиной и нитратом и со смесью щетины, пера и нитрата соответственно) – на 3-и сут, однако значения активности при использовании этих сред для роста продуцента достигали лишь 41,0 – 62,5% от активности на среде 8 с нитратом, куриным пером и гидролизатом рыбной муки.

Увеличение количества легкодоступного углерода и азота в ферментационных средах (ГРМ и глюкозы) имело значительное влияние на уровень кератинолитической активности только на среде 8 с перемолотым куриным пером, однако на средах со свиной щетиной такого эффекта не было (рис. 2), но стоит отметить, что пики активности были достигнуты раньше – на 5-е и 3-и сут на 9 (нитрат, щетина, ГРМ) и 10 (нитрат, щетина, перо, ГРМ) средах соответственно.

Таблица 2

Условия проведения ферментативных реакций с окрашенными белками и измерения количества образовавшегося продукта

Субстрат	Концентрация субстрата, %	Состав реакционной смеси			Время проведения реакции, ч	Длина волны для измерения оптической плотности, нм
		Объем субстрата, мкл	Объем пробы, мкл	Объем ТХУ, мкл		
Азоказеин	0,2	200	100	300	0,5	340
Азоколлаген	0,2	200	100	300	6	520
Hide Powder Azure	0,2	200	100	300	6	595
Эластин-конго красный	0,2	200	100	300	24	495
Кератин-азур	2	50	150	200	48	595

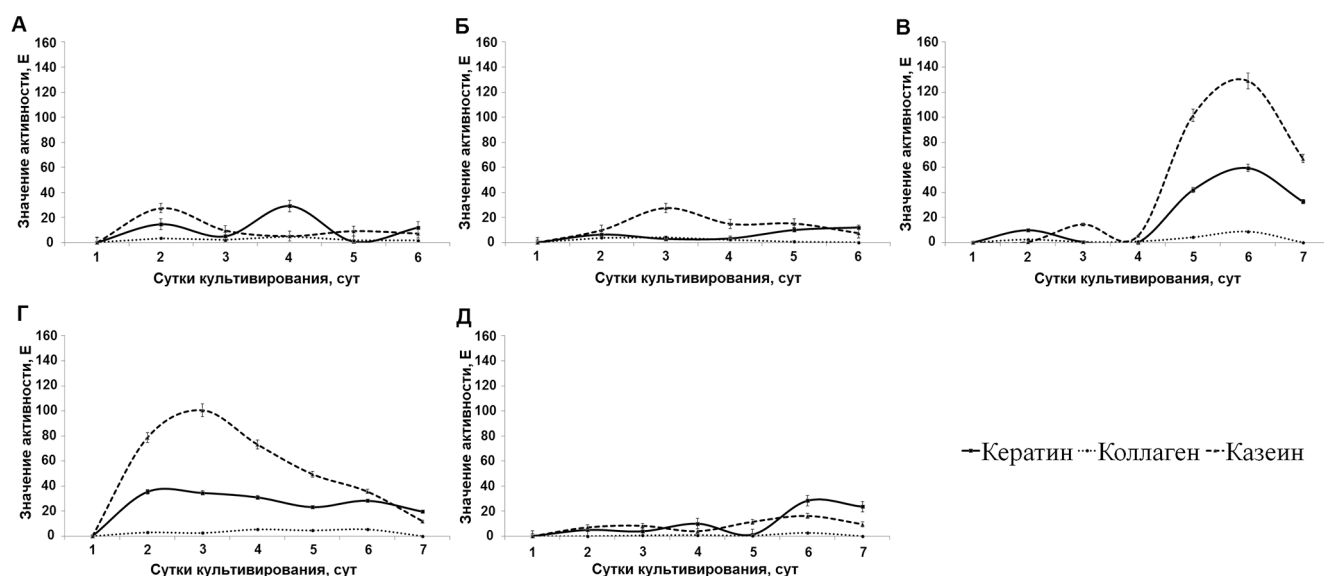


Рис. 1. Динамика накопления внеклеточных протеаз *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на средах: А – среде 1 с нитратом натрия, Б – среде 2 с перемолотым куриным пером, В – на среде 3 с измельченной свиной щетиной, Г – на среде 4 с нитратом натрия и перемолотым куриным пером, Д – на среде 5 с перемолотым куриным пером и измельченной щетиной.

Также положительно на уровень секреции целевых ферментов влияло присутствие нитратов. При сравнении сред 4 и 2 (перо с нитратом и без, рис. 1), 7 и 5 (комбинация пера и щетины с нитратом и без, рис. 1 и 2), видно, что активность на средах с нитратом выше. Кроме того, на среде 7 максимальные значения активности (52,3 Е) наблюдались раньше, чем на среде 5, но в другой паре сравниваемых сред — 4 и 2 — добавление нитрата не ускорило накопление кератиназ, пики активности в обоих случаях приходятся на 6-е сут. На средах 6 и 3 (щетина с нитратом и без него, рис. 1, 2) результаты также отличаются — нитрат дает выигрыш в скорости, но на среде без нитрата более высокие значения активности. При этом на среде 1 (рис. 1), не содержащей органических источников азота, а содержащей только нитрат, пик активности достигается достаточно быстро (на 4-е сут), однако значения активности низкие (менее 30,0 Е).

Полученные данные согласуются с тем, что синтез большинства известных кератинолитических ферментов является индуцибельным. Важно отметить преимущество смешенного по азоту питания *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с наличием легкоусвояемого органического азота для получения кератиназ. Несмотря на способность протеолитических ферментов изучаемого продуцента гидролизовать альфа-кератин, предпочтительным субстратом для роста этого микромицета в глубинных условиях является перо — источник бета-кератина.

Коллаген — самый распространенный белок животных, также широко представлен в отходах животноводства. Однако коллагенолитическая активность у *A. clavatus* ВКПМ F-1593 оказалась

низкой. Максимальные значения активности (33,0 Е) наблюдали на среде с пером и ГРМ на 3-и сут культивирования. Интересно, что на этой же среде были обнаружены максимальные значения кератинолитической активности. На других средах коллагенолитическая активность оказалась пренебрежимо мала (не более 7,0 Е).

Общую протеолитическую активность, являющуюся важной характеристикой для ферментов в сфере биodeградации из-за необходимости гидролизовать не только целевые, но и примесные белки, *A. clavatus* ВКПМ F-1593 оценивали по уровню гидролиза казеина. Максимальные значения активности (129,0 Е) отмечали на среде 3 со свиной щетиной, для которой также была обнаружена высокая кератинолитическая активность. При этом пики активности совпадают и приходятся на 6-е сут.

Также высокая протеолитическая активность обнаружена на средах 7 (111,9 Е), 6 (104,4 Е) и 4 (100,5 Е) — это совпадает с высокими показателями кератинолиза. При этом для сред 6 и 7 пики активности кератинолиза и казеинолиза совпадают, в то время как для среды 4 пик кератинолитической активности приходится на 6-е сут, а казеинолитической — на 3-и сут культивирования. В большинстве случаев на описанных выше средах пики активности кератинолиза и казеинолиза не совпадают, что говорит о проявлении активности разных протеолитических ферментов.

Для дальнейших исследований получали ферментный препарат при культивировании продуцента на среде 8 с ГРМ, куриным пером и нитратом, показавшей наиболее высокие значения кератинолитической активности. Белки культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония,

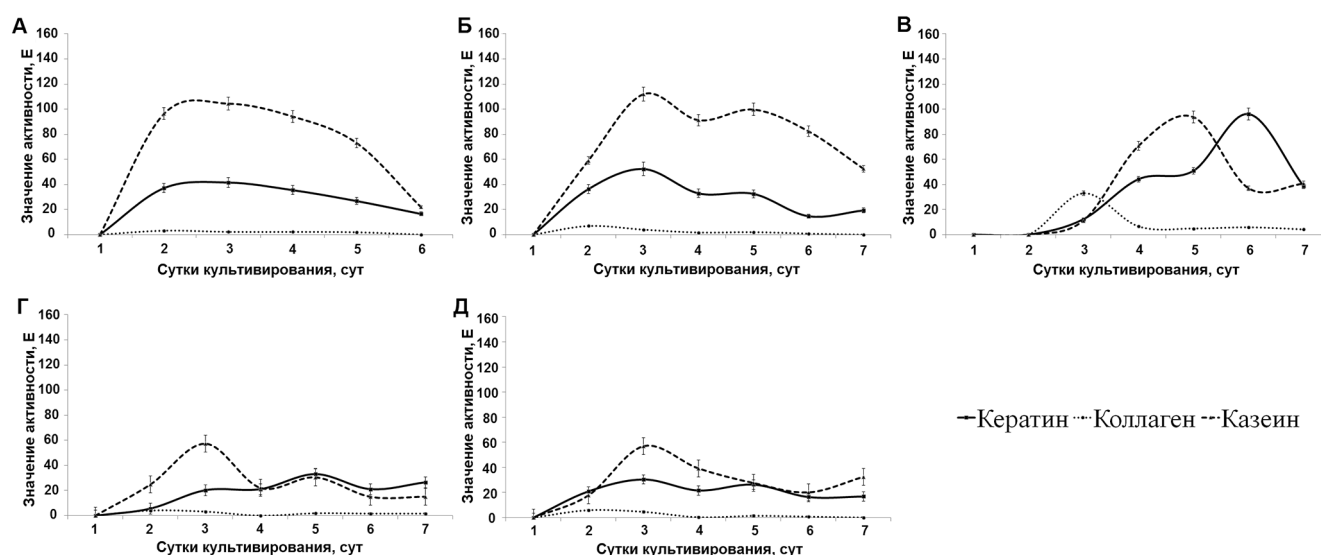


Рис. 2. Динамика накопления внеклеточных протеаз *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на средах: А — на среде 6 с нитратом натрия и измельченной свиной щетиной, Б — на среде 7 с нитратом натрия, перемолотым пером и измельченной свиной щетиной, В — на среде 8 с нитратом натрия, перемолотым куриным пером и гидролизатом рыбной муки, Г — на среде 9 с нитратом натрия, измельченной свиной щетиной и гидролизатом рыбной муки, Д — на среде 10 с нитратом натрия, перемолотым куриным пером, свиной щетиной и гидролизатом рыбной муки.

полученный осадок отделяли от жидкости центрифугированием на холоду и диализовали. Полученный раствор лиофильно высушивали и затем препарат использовали для очистки сериновой щелочной протеазы с рI 9,3, что соответствовало ранее полученным данным [18].

Активность выделенной кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 сравнивали с активностью коммерческой протеиназы К с использованием окрашенных белковых субстратов. Отношения протеолитической активности ферментов, полученной при проведении реакций с различными субстратами, к кератинолитической представлены в табл. 3.

Как видно из результатов, оба фермента не обладали эластолитической активностью, а внеклеточная протеаза *A. clavatus* ВКПМ F-1593 показала более низкие значения фибринолитической активности (1,21), чем протеиназа К (2,52), что могло бы свидетельствовать о большем потенциале изучаемой кератиназы в качестве компонента медицинских препаратов, однако относительные величины ферментативной активности протеазы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с азоказеином (3,52) и Hide Powder Azure (0,75) выше, чем у протеиназы К (1,93 и 0,07 соответственно), и говорят о большей общей протеолитической активности фермента. Это может быть свидетельством большей пирогенности, в то же время столь высокая общая протеолитическая активность является положительным свойством для применения фермента в биodeградации, так как позволит расщеплять сопутствующие белковые субстраты. Значения активности при проведении реакций с азоколлагеном и кератин-азуром оказались относительно невысокими для обеих протеаз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Safaric R., Frasz Zemljic L., Novak M., Dugonik B., Bratina B., Gubelj N., Bolka S., Strnad S. Preparation and characterisation of waste poultry feathers composite fibreboards. *Materials*. 2020;13(21):4964.
2. Nnolim N.E., Udenigwe C.C., Okoh A.I., Nwodo U.U. Microbial keratinase: next generation green catalyst and prospective applications. *Front. Microbiol.* 2020;11:580164.
3. Chen H., Gao S., Li Y., Xu H.J., Li W., Wang J., Zhang Y. Valorization of livestock keratin waste: application in agricultural fields. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022;19(11):6681.
4. de Menezes C.L.A., Santos R.D.C., Santos M.V., Boscolo M., da Silva R., Gomes E., da Silva R.R. Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021;37(5):86.
5. Sypka M., Jodłowska I., Białkowska A.M. Keratinases as versatile enzymatic tools for sustainable development. *Biomolecules*. 2021;11(12):1900.

Таблица 3
Протеолитическая активность кератиназы *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 (рI 9,3) и протеиназы К по отношению к различным белковыми субстратам

Субстрат	Отношение протеолитической активности к кератинолитической	
	Кератиназа <i>A. clavatus</i>	Протеиназа К
Азоказеин	3,52	1,93
Азоколлаген	0,34	0,07
Кератин-азур	0,19	0,34
Фибрин	1,21	2,52
Эластин-конго красный	0,05	0,01
Hide Powder Azure	0,75	0,07

Таким образом, была показана возможность получения кератинолитических ферментов при культивировании микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 в глубинных условиях на отходах животноводства – курином перье и свиной щетиной. Выделенная протеаза и описанная ранее [18] по своим свойствам не уступают коммерческому аналогу – грибной кератиназе протеиназе К. Также кератинолитическая протеаза *A. clavatus* ВКПМ F-1593 показала более высокий уровень общей протеолитической активности, что является важным качеством для фермента, нацеленного на использование в области биodeградации отходов.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00674). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

6. Tamreihao K., Mukherjee S., Khunjamayum R., Devi L.J., Asem R.S., Ningthoujam D.S. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production. *J. Basic Microbiol.* 2019;59(1):4–13.
7. Gong J.S., Ye J.P., Tao L.Y., Su C., Qin J., Zhang Y.Y., Li H., Li H., Xu Z.H., Shi J.S. Efficient keratinase expression via promoter engineering strategies for degradation of feather wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 2020;137:109550.
8. Li Q. Structure, application, and biochemistry of microbial keratinases. *Front. Microbiol.* 2021;12:674345.
9. Liaqat I., Ali S., Butt A., Durrani A.I., Zafar U., Saleem S., Naseem S., Ahsan F. Purification and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* dcs1 for poultry waste processing. *J. Oleo Sci.* 2022;71(5):693–700.
10. Wang Z., Chen Y., Yan M., Li K., Okoye C.O., Fang Z., Ni Z., Chen H. Research progress on the degradation mechanism and modification of keratinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2023;107(4):1003–1017.

11. Gupta R., Rajput R., Sharma R., Gupta N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013;97(23):9931–9940.
12. Shestakova A., Lyamina V., Timorshina S., Osmolovskiy A. Patented keratinolytic enzymes for industrial application: an overview. *Recent Pat. Biotechnol.* 2023;17(4):346–363.
13. Kushnirov V.V., Dergalev A.A., Alexandrov A.I. Proteinase K resistant cores of prions and amyloids. *Prion.* 2020;14(1):11–19.
14. Brilhante R.S.N., Lopes R.G.P., de Aguiar L., de Oliveira J.S., Araújo G.D.S., Paixão G.C., Pereira-Neto W.A., Freire R.S., Nunes J.V.S., de Lima R.P., Santos F.A., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G. Inhibitory effect of proteinase K against dermatophyte biofilms: an alternative for increasing the antifungal effects of terbinafine and griseofulvin. *Biofouling.* 2022;38(3):286–297.
15. De Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* 2015;46(2):337–346.
16. Alwakeel S.S., Ameen F., Al Gwaiz H., Sonbol H., Alghamdi S., Moharram A.M., Al-Bedak O.A. Keratinases produced by *Aspergillus stelliformis*, *Aspergillus sydowii*, and *Fusarium brachygibbosum* isolated from human hair: yield and activity. *J. Fungi.* 2021;7(6):471.
17. Qiu J., Barrett K., Wilkens C., Meyer A.S. Bioinformatics based discovery of new keratinases in protease family M36. *N. Biotechnol.* 2022;68:19–27.
18. Timorshina S., Popova E., Kreyer V., Baranova N., Osmolovskiy A. Keratinolytic properties of *Aspergillus clavatus* promising for biodegradation. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;19(21):13939.
19. Тиморшина С.Н., Осмоловский А.А., Александрова А.В. Штамм *Aspergillus clavatus* – продуцент протеолитических ферментов с кератинолитической активностью. Патент РФ № 2774366. Дата выдачи: 17.06.2022.
20. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* 1-1 and *Aspergillus ustus* 1. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016;71(1):62–66.
21. Timorshina S.N., Popova E.A., Galiakberova A.A., Ochneva A.G., Osmolovskiy A.A. *Aspergillus* proteolytic enzymes hydrolyzing fibrillar proteins for biomedicine and biotechnological processes. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(3):178–183.

Поступила в редакцию 05.08.2023

После доработки 28.11.2023

Принята в печать 29.11.2023

RESEARCH ARTICLE

Keratinolytic potential of micromycete *Aspergillus clavatus* VKPM F-1593 and comparison of its enzymes with the commercial keratinase preparation

S.N. Timorshina¹ , E.A. Popova¹ , K.I. Kuleshova¹,
A.K. Akyol^{1, 2}, A.A. Osmolovskiy^{1, *} 

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

²Faculty of Science, Bursa Uludag University, 16059 Nilüfer, Bursa, Görükle Kampüsü,
*e-mail: aosmol@mail.ru

Animal husbandry is a rapidly developing branch of agriculture, increasing the volume of production annually, and keratin-containing waste (feathers, bristles) make up the majority of all waste from this industry. The development of methods of environmentally friendly processing of such waste to obtain valuable resources (amino acids and oligopeptides) is an important mission of modern science, including biotechnology. One of the ways to dispose of animal husbandry waste that meets modern trends in the development of a green economy is the use of microorganisms and their enzymes. The possibility of obtaining keratinolytic enzymes of *Aspergillus clavatus* VKPM F-1593 under deep conditions with various sources of nitrogen and carbon, including with the growth of the producer on animal waste, was studied. The highest target activity (96.1 E) was achieved using mixed carbon and nitrogen sources: inorganic – sodium nitrate, easily digestible organic – fish meal hydrolysate and hard-to-reach organic – ground chicken feather. Varying the content of various substrates in the composition of fermentation media allowed not only to regulate the level of proteolytic activity, but also to reach the peak of producer activity on different days of cultivation. The specific keratinase activity of *A. clavatus* VKPM F-1593 (pI 9.3) to various protein substrates with the activity of a commercial proteinase K. Both enzymes showed a similar level of activity regarding most of the substrates used. However, protease *A. clavatus* VKPM F-1593 has a greater overall proteolytic activity, which confirms the prospects of this culture for biodegradation of animal waste.

Keywords: *keratinases, keratinolytic enzymes, keratin, Aspergillus clavatus, proteinase K, biodegradation*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-24-00674.

Сведения об авторах

Тиморшина Светлана Наильевна — мл. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: timorshina.svetlana@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2963-4368>

Попова Елизавета Андреевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: e.a.popova1994@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0334-4234>

Кулешова Ксения Игоревна — студентка первого курса магистратуры биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: kulesh-ksu@yandex.ru

Акьол Айдын Кутай (Akyol Aydin Kutay) — студент университета Улудаг, стажер каф. микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: kutayakyol.ka@gmail.com

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 591.112.1

Влияние пробенецида на проаритмические эффекты активации альфа-1-адренорецепторов в атриовентрикулярном узле сердца крысы

Я.А. Воронина^{1, *} , В.С. Кузьмин^{1, 2} 

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

²Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

*e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru

В ткани сердца присутствуют адренорецепторы (АР) не только бета-типа, но и альфа-типа (α -АР). Оба типа АР принимают участие в регуляции электрической активности кардиомиоцитов различных отделов сердца, включая кардиомиоциты атриовентрикулярного узла (АВУ). Смещение баланса передачи адренергических сигналов в сторону α_1 -АР способствует появлению нарушений проведения возбуждения в различных отделах сердца и возникновению аритмий. Поскольку активация α_1 -АР усиливает анионную проводимость, цель настоящей работы заключалась в изучении влияния блокады хлорных каналов на α -адренергические нарушения АВУ-проведения возбуждения. Для этого оценивали время проведения в АВУ, рефрактерность АВУ и характер нарушений проведения в АВУ с помощью методики изолированного по Лангендорфу сердца крысы (самцы Wistar, 250 ± 30 г) с регистрацией предсердной и желудочковой электрограмм. В качестве агониста α_1 -АР использовали фенилэфрин (ФЭ, $10 \mu\text{M}$), в качестве блокатора анионной (хлорной) проводимости использовали пробенецид ($100 \mu\text{M}$). Установили, что активация α_1 -АР их агонистом ФЭ приводит к статистически значимому увеличению длительности атриовентрикулярной задержки ($N = 10$, $p < 0,001$) и эффективного рефрактерного периода (ЭРП) на $9,8\% \pm 1,2\%$, ($N = 10$, $p < 0,001$) в АВУ. При частоте стимуляции, близкой к ЭРП, ФЭ индуцирует блоки проведения в АВУ и осцилляции длительности задержки в АВУ ($N = 10$). При нестационарном характере проведения возбуждения в АВУ на фоне ФЭ пробенецид статистически значимо уменьшает величину осцилляций длительности задержки в АВУ. Кроме того, ЭРП при действии ФЭ на фоне пробенецида оказывается более коротким (107 ± 4 мс – ФЭ на фоне пробенецида, $114,2 \pm 5,35$ мс – ФЭ), то есть возвращается к значениям, характерным для нормальных условий. В итоге пробенецид способствует поддержанию проведения в АВУ на фоне активации α_1 -АР. Подавление пробенецидом проаритмических эффектов активации α_1 -АР в АВУ указывает на вовлеченность хлорных ионных каналов и анионных переносчиков в формирование аритмий в АВУ.

Ключевые слова: α_1 -адренорецепторы, атриовентрикулярный узел, атриовентрикулярные блоки, пробенецид, хлорные каналы, аритмия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-7

Введение

Нарушения функционирования атриовентрикулярного узла (АВУ) сердца, представляющие собой избыточную задержку, блокаду или изменение естественной последовательности передачи волны возбуждения от предсердия к желудочковой проводящей системе, широко распространены, отягчают и осложняют течение других сердечно-сосудистых патологий, в том числе таких, для

которых характерны гипертрофические изменения миокарда [1]. Нарушения проведения возбуждения в АВУ служат причиной формирования аритмий различного типа. Блокады в АВУ встречаются у 40% лиц пожилого возраста и приводят к ухудшению гемодинамики, кровоснабжения органов, включая само сердце. Пациенты с нарушениями АВУ подвержены значительному риску аритмий, включая фибрилляцию [2], а также

рisku внезапной сердечной смерти [3]. Фармакологическая терапия блокад проведения в АВУ или аритмий не является эффективной [4], поскольку АВУ является крайне сложно организованной структурой, а молекулярные и тканевые механизмы дисфункции миокарда АВУ установлены лишь частично.

Электрофизиологические свойства АВУ находятся под тесным контролем вегетативной нервной системы; ее дисфункция часто приводит к аритмиям и блокадам проведения в АВУ. Быстрая регуляция биоэлектрической активности миокардиальной ткани АВУ, как и других отделов сердца, симпатическим отделом вегетативной нервной системы в норме реализуется преимущественно посредством β_1 -адренорецепторов (β_1 -АР). Однако в миокарде помимо β_1 -АР присутствуют адренорецепторы α_1 -типа (α_1 -АР) [5]. Установлено, что стимуляция α -АР сердца вызывает разнообразные нарушения проведения в АВУ [6, 7], поэтому α_1 -АР кардиомиоцитов АВУ вовлечены в формирование нарушений ритма сердца. Стимуляция α -АР и их внутриклеточных сигнальных путей приводит не только к изменению биоэлектрической активности, но и к ремоделированию кардиомиоцитов [8]. Развитие сердечно-сосудистых патологий — например, гипертрофической перестройки миокарда — сопровождается изменением соотношения экспрессируемых подтипов адренорецепторов [9]. Аритмии и блокады в АВУ часто сопровождают гипертрофические изменения в сердце [1].

В гладкомышечных клетках активация α_1 -АР приводит к деполяризации и сократительным ответам за счет целого спектра внутриклеточных механизмов. К таким механизмам относятся стимуляция трансмембранного анионного транспорта, усиление хлорной проводимости и активация хлорных ионных каналов, в том числе — трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) [10–13]. Механизмы реализации эффектов активации α_1 -АР в АВУ не исследованы, однако известно, что, как и в гладкомышечных клетках, в миокарде экспрессируется значительное количество хлорных каналов и анионных транспортеров [14–16]. Одним из механизмов нарушения проведения в АВУ при стимуляции α_1 -АР может являться усиление анионной проводимости за счет активации хлорных каналов кардиомиоцитов АВУ. В таком случае подавление хлорной/анионной проводимости может предотвращать дисфункции АВУ, вызванные стимуляцией α_1 -АР.

В данной работе исследуются эффекты стимуляции α_1 -АР АВУ, роль анионного/хлорного трансмембранного транспорта в регуляции электрофизиологических свойств АВУ при стимуляции α_1 -АР, а также возможность модуляции аритмогенного действия стимуляции α_1 -АР в АВУ.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием препаратов изолированного сердца крысы (самцы стока Wistar, 2–4 мес., 250 ± 30 г). В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (№ 123, Страсбург, 18 марта 1986 г.). Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России (№ ЛЭС/01.11.23). Перед экспериментами животных содержали в виварии течение 2 нед. в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

В экспериментах использовали изолированное сердце крысы, ретроградно перфузируемое (по Лангендорфу) при постоянном перфузионном давлении (80 мм рт. ст.). После предварительной анестезии (3,5% изофлюрана в смеси с кислородом) и гепаринизации (1000 ед./кг, внутривенно) крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку и извлекали сердце, которое помещали в ванночку с холодным перфузионным раствором (4°C) и отмывали от крови. Затем препарат сердца крысы через аорту фиксировали на канюле и осуществляли ретроградную перфузию при 37°C; для перфузии использовали раствор Кребса-Хензеля следующего состава (в мМ): NaCl — 118,5, KCl — 4,7, CaCl₂ — 2,5, NaHCO₃ — 25, KH₂PO₄ — 1,2, MgSO₄ — 1,2, глюкоза — 11. Перфузионный раствор непрерывно насыщали карбогеном (90% O₂, 5% CO₂) для оксигенации и стабилизации pH (7,4). Во всех экспериментах в препаратах изолированного сердца коронарный проток составлял не менее 10 мл/мин.

После подключения изолированного сердца к перфузионной установке с помощью микроманипуляторов на поверхность левого предсердия (в области основания ушка предсердия), а также на поверхность левого желудочка в области «верхушки» сердца помещали биполярные серебряные электроды для регистрации электрограмм (ЭГ). ЭГ регистрировали с помощью дифференциального усилителя (Нейробиолаб, NBL302, Россия); усиленный и отфильтрованный сигнал регистрировали с помощью аналого-цифрового преобразователя (5 КГц, E-154, L-Card, Россия), подключенного к персональному компьютеру; для записи и обработки ЭГ использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3 (Ди-софт, Россия).

После 10 мин адаптации изолированного сердца определяли длительность интервалов между возбуждениями предсердий и величину атрио-

вентрикулярной задержки (AB3) при естественном «синусном» ритме. Затем биполярные стимулирующие электроды, подключенные к аналоговому изолятору и генератору импульсов (Нейробиолаб, DL360, Россия), размещали на границе правого предсердия и предсердной перегородки, предварительно разрушив синоатриальный узел путем удаления миокарда межвенной области правого предсердия. С постоянными межстимульными интервалами (S1S1) наносили возбуждающие стимулы (2 мс, 2–6 В), вызывающие возбуждение предсердий с частотой на 10% больше «синусного» ритма (180 ± 20 мс).

Оценивали следующие функциональные характеристики АВУ: длительность (1) и величину осцилляций (2) АВЗ при антероградном (предсердно-желудочковом) режиме проведения возбуждения, длительность эффективного рефрактерного периода (ЭРП) АВУ (3), значение «точки Венкебаха» (ТВ) (4), а также встречаемость блоков проведения в АВУ (5). Использовали следующий протокол: каждые 30 с уменьшали длительность S1S1 от «синусового» ритма на 10 мс вплоть до 110 мс, далее S1S1 уменьшали с шагом 5 мс, а начиная с величины S1S1 = 100 мс – с шагом 2 мс вплоть до ЭРП.

Длительность ЭРП определяли как наибольший S1S1, при котором возбуждение желудочков происходит в ответ лишь на каждый второй очередной возбуждающий стимул. Для каждого значения S1S1 величину АВЗ определяли как разницу между моментом возникновения предсердного и желудочкового кардиоцикла. Блок проведения в АВУ определяли по отсутствию возбуждения желудочков после очередного стимула. Встречаемость блоков проведения в АВУ рассчитывали для каждого препарата как отношение количества блоков проведения в АВУ к общему количеству кардиоциклов при длительности межстимульных интервалов, соответствующих ТВ. Значение ТВ определяли как S1S1, при котором возникает хотя бы единичный блок проведения в АВУ в течение 30 с. Величину осцилляций АВЗ (ΔAB , т.е. разброс между самыми короткими и самыми длинными АВЗ) рассчитывали по формуле, приведенной ниже:

$$\Delta AB = \frac{AB_{n-1} - AB_{n+1}}{S1S1_{TB}} \cdot 100,$$

где AB_{n-1} – длительность АВЗ (наибольшая) в цикле, предшествующем блоку проведения в АВУ, AB_{n+1} – длительность АВЗ (наименьшая) в цикле, последующем блоку проведения в АВУ, $S1S1_{TB}$ – величина межстимульных интервалов в ТВ (рис. 1А).

После определения функциональных характеристик АВУ в контрольных условиях ($N = 20$) устанавливали «исходную» частоту стимуляции на 20 мин, затем определяли функциональные харак-

теристики либо в присутствии 0,1–10 μ М агониста α_1 -АР фенилэфрина (ФЭ, группа 1, $N = 10$), либо в присутствии 100 μ М блокатора анионной проводимости сульфонилсодержащего производного бензойной кислоты пробенецида (ПРБ, группа 2, $N = 10$). Затем у части препаратов группы 1 проводили регистрацию функциональных характеристик АВУ при одновременном действии 10 μ М ФЭ и 100 μ М ПРБ ($N = 6$), а часть препаратов ($N = 4$) использовали в качестве временного контроля.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). После предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Вилка статистически значимые различия между группами выявляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением апостериорных тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми значениями, а также внесением поправки Даннета. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего за исключением репрезентативных записей.

Результаты и обсуждение

Длительность антероградной АВЗ зависит сложным образом от S1S1. В наших экспериментах при спонтанном «синусном» ритме (210 ± 15 мс), наблюдаемом в ИС, длительность АВЗ составляет 55 ± 8 мс; в условиях навязываемого ритма при S1S1 = 180 мс, что эквивалентно частоте сердечных сокращений (ЧСС) 330 уд./мин, т.е. ЧСС, наблюдаемой *in vivo* у крыс, лишенных модуляции со стороны вегетативной нервной системы, величина АВЗ составляет 47 ± 8 мс (рис. 1Б, В). При S1S1 = 120 и 110 мс, что соответствует максимальной наблюдаемой ЧСС у крыс (500–550 уд./мин), длительность АВЗ увеличивается до 60 ± 7 мс и 65 ± 8 мс соответственно.

Величина ЭРП в наших экспериментах в контрольных условиях составила 104 ± 11 мс. Важно отметить, что в контрольных условиях ЭРП и ТВ совпадают в большей части экспериментов, то есть для АВУ крыс не характерны осцилляции длительности АВЗ, предшествующие формированию блоков проведения: в контрольных условиях осцилляции длительности АВЗ наблюдаются у 10% препаратов.

Стимуляция α_1 -АР агонистом ФЭ в концентрации 0,1–1 μ М не приводит к заметным изменениям длительности АВЗ ($p > 0,1$) либо ЭРП ($p > 0,1$). Однако при действии ФЭ в концентрации 10 μ М наблюдается статистически значимое увеличение длительности АВЗ при всех значениях S1S1: при S1S1 = 180 мс увеличение АВЗ составляет $40 \pm 5\%$ (от 47,2 мс до 66,1 мс, $p < 0,001$); при S1S1 = 120 мс увеличение АВЗ, вызванное

ФЭ, оказывается более выраженным и составляет $57 \pm 10\%$ (от 51 мс до 79 мс, $p < 0,001$, рис. 1Б, В). Таким образом, влияние ФЭ на АВЗ пропорционально частоте активации АВУ в экспериментальных условиях и, вероятно, эффект активации α_1 -АР зависит от ЧСС животных *in vivo*. Иными словами, ФЭ демонстрирует т.н. «прямую ритмо-зависимость», характерную для некоторых соединений, влияющих на электрофизиологические свойства миокарда.

ФЭ ($10 \mu\text{M}$) вызывает увеличение ЭРП на $9,8\% \pm 1,2\%$ ($p < 0,001$). ФЭ также приводит к небольшому увеличению значения ТВ. Важно, что при действии ФЭ ($10 \mu\text{M}$), в отличие от контрольных экспериментов, во всех случаях наблюдали осцилляции длительности АВЗ при S1S1, близких к ЭРП. Величина осцилляций АВЗ при действии ФЭ составляла $27 \pm 6\%$ (рис. 3В). Встречаемость блоков проведения в АВУ при действии ФЭ составила $22,5 \pm 7\%$.

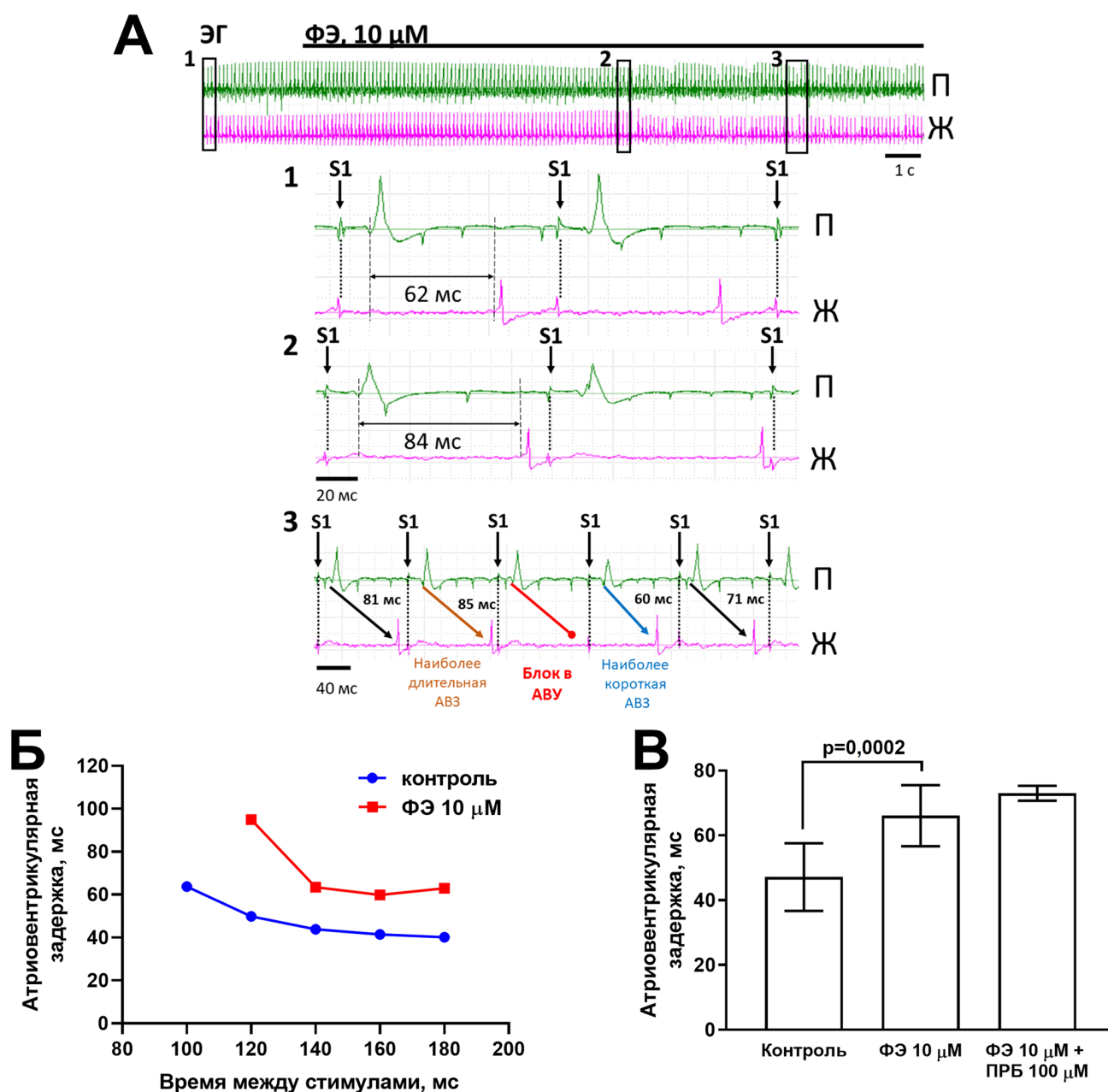


Рис. 1. Влияние стимуляции α_1 -АР на длительность атриовентрикулярной задержки (АВЗ) в контроле и на фоне ПРБ. **А.** Электрограммы (ЭГ), регистрируемые при действии агониста α_1 -АР (ФЭ, $10 \mu\text{M}$). S1 – моменты нанесения возбуждающих стимулов и артефакты электрической стимуляции. 1 – ЭГ предсердия (П) и желудочка (Ж) в контроле (при длительности интервала между возбуждающими стимулами 150 мс, длительность АВЗ составляет 62 мс); 2 – ЭГ через 20 с действия ФЭ (длительность АВЗ составляет 84 мс); 3 – блок в атриовентрикулярном узле (АВУ) и альтернации длительности. При длительности межстимульных интервалов, соответствующей точке Венкебаха, кардиоцикл, предшествующий блоку проведения в АВУ, имеет наибольшую величину АВЗ, а кардиоцикл, следующий после блока проведения в АВУ, имеет наименьшую величину АВЗ при данной частоте стимуляции. **Б.** Репрезентативный пример увеличения длительности АВЗ при действии ФЭ при разных S1S1. **В.** Влияние пробенецида (ПРБ, $100 \mu\text{M}$) на увеличение АВЗ, вызванное ФЭ при S1S1 = 180 мс.

Таким образом, активация α_1 -АР в АВУ крыс вызывает негативный дромоторпный эффект: увеличивает длительность АВЗ, его рефрактерность, способствует возникновению нестационарных режимов проведения и блоков проведения возбуждения — вероятно, за счет усиления функциональной гетерогенности ткани — а также снижает диапазон ЧСС, в котором АВУ способен передавать возбуждение к желудочковой проводящей системе. Эти эффекты могут рассматриваться как проаритмические, поскольку способствуют возникновению аритмий по типу re-entry в АВУ. Физиологическое значение «прямой ритмозависимости» влияния α_1 -АР на АВЗ может быть связано с необходимостью поддержания длительности диастолы и увеличением времени наполнения желудочков, которое оказывается сниженным при высокой ЧСС и активации симпатического отдела вегетативной нервной системы.

ПРБ (100 μ М) не оказывает влияния на АВЗ в контрольных условиях и не изменяет увеличение АВЗ, вызываемое ФЭ (рис. 1В). Однако ПРБ (100 μ М) подавляет увеличение ЭРП в АВУ, вызванное стимуляцией α_1 -АР (рис. 2А, Б). При действии ФЭ (10 μ М) на фоне ПРБ (100 μ М) длительность ЭРП составляет 107 ± 4 мс, что статистически значимо меньше ($p < 0,05$), чем при самостоятельном действии ФЭ и близко к длительности ЭРП в контрольных условиях. Возвращая длительность ЭРП к контрольным значениям, ПРБ способствует сохранению проведения возбуждения в АВУ, активации желудочков в физиологическом диапазоне, предотвращению блоков проведения в АВУ при высоких значениях ЧСС на фоне стимуляции α_1 -АР.

ПРБ (100 μ М) не вызывает изменения ТВ, а также не приводит к изменению ТВ на фоне действия ФЭ (рис. 3Г). ПРБ (100 μ М) не оказывает влияния на встречаемость блоков проведения в АВУ, вызванных ФЭ ($p > 0,1$). ПРБ (100 μ М) значительно уменьшает амплитуду осцилляций дли-

тельности АВЗ, вызванных ФЭ (от 26 ± 3 до $17 \pm 2\%$, $N = 3$, в тех экспериментах, где они сохраняются; рис. 3А–В).

В нашей работе впервые детально изучены эффекты стимуляции α_1 -АР в АВУ и показано, что эти эффекты являются аритмогенными. Следует отметить, что проаритмические эффекты стимуляции α_1 -АР характерны не только для АВУ. Активация α_1 -АР вызывает подавление проведения волны возбуждения и функциональную невозбудимость в миокарде предсердной перегородки [17], миокардиальных обкладках легочных [18] и полых вен, а также в других структурах сердца, способных, в тех или иных условиях, к автоматической активности. В работах, ранее проведенных в нашей лаборатории, показано, что активация α_1 -АР у крыс приводит к формированию блоков проведения возбуждения в миокарде торакальных вен и способствует формированию аритмий по типу re-entry [19]. Как указано выше, аритмогенные эффекты α_1 -АР могут усиливаться при ремоделировании миокарда. Смещение баланса передачи адренергических сигналов от преимущественно β -адренергических к α_1 -адренергическим путям, которое, например, может происходить при гипертрофических изменениях в сердце, вероятно, способствует появлению аритмий в АВУ. Несомненно, электрофизиологические механизмы наблюдаемых в АВУ феноменов при стимуляции α_1 -АР многообразны. Однако, как указано выше, один из механизмов может быть связан с изменением анионной/хлорной трансмембранной проводимости в АВУ.

Профиль экспрессии ионных каналов и переносчиков в АВУ отличается от такового в рабочем миокарде камер сердца, поскольку клеточные предшественники и эмбриональное происхождение этих структур различны [20]. Известно, что АВУ является крайне гетерогенной структурой [21]. Вероятно, соотношение хлорных транспортеров NKCC1 и KCC2, отвечающих за внутриклеточную концентрацию ионов хлора

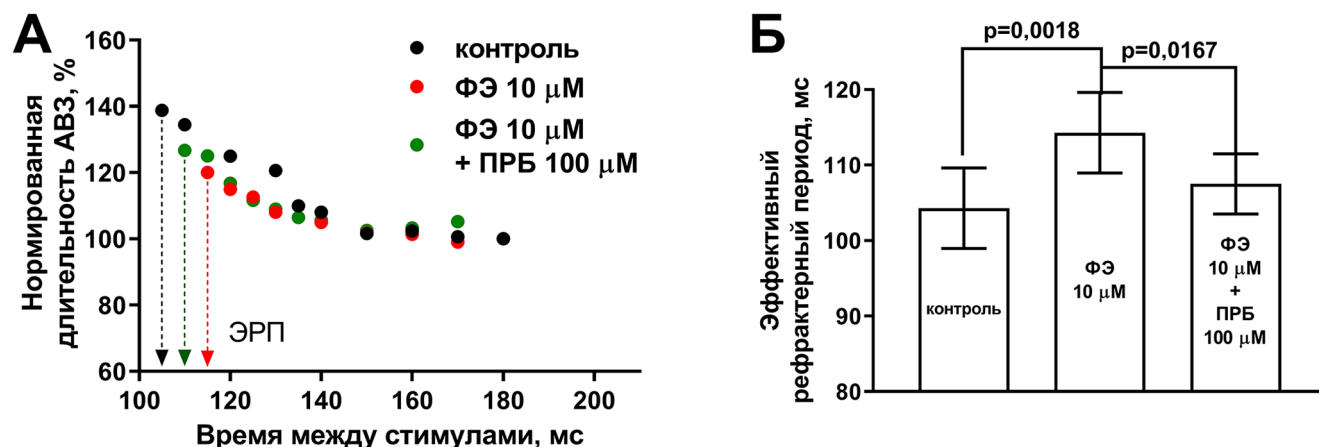


Рис. 2. Влияние пробенецида (ПРБ) на увеличение длительности эффективного рефрактерного периода (ЭРП) атриовентрикулярного узла (АВУ), вызванное стимуляцией α_1 -АР фенилэфрином (ФЭ, 10 μ М). А. Репрезентативный пример. Б. Величина ЭРП АВУ в контроле, при действии ФЭ и при действии ФЭ на фоне ПРБ.

и хлорный равновесный потенциал, различно в центральной и периферической частях АВУ и отличается от такового в рабочем миокарде. В центральной части АВУ, по аналогии с миокардом синоатриального узла, хлорный равновесный потенциал может быть положительнее, а на периферии отрицательнее потенциала покоя. Поэтому активация анионных/хлорных переносчиков может приводить в разных участках АВУ как к гиперполяризации, так и к деполяризации [16].

Вследствие гетерогенности небольшие или разнонаправленные изменения мембранного потенциала в отдельных участках АВУ могут приводить к нарушению проведения в АВУ [22]: невозбудимости в центральной части или невозможности передачи возбуждения на границе ткани АВУ и ткани желудочковой проводящей системы.

Показано, что α_1 -АР регулируют хлорную проводимость в гладкомышечных клетках за счет модуляции мембранных хлорных каналов CFTR. Установлено, что CFTR играют важную роль в регуляции сократимости гладкомышечных клеток и тонуса сосудов [12, 13]. В настоящее время показано, что CFTR экспрессируются и являются функционально активными в кардиомиоцитах [23], в том числе в кардиомиоцитах сердца крысы [24]. Физиологическая роль CFTR в миокарде установ-

лена не до конца, однако предполагается, что эти хлорные каналы определяют скорость сокращения кардиомиоцитов [25], примембранную концентрацию Ca^{2+} , участвуют в регуляции pH, объема кардиомиоцитов, секреции кардиомиоцитами АТФ [24, 26, 27].

CFTR известен как цАМФ-зависимый хлорный канал [28]. Однако CFTR проницаем также для бикарбонат-анионов [24]. Хорошо известна регуляция CFTR со стороны β_1 - и β_2 -АР, а также протеинкиназы А [29, 30]. Внутриклеточные сигнальные пути α_1 -АР также вовлечены в регуляцию CFTR: показано, что протеинкиназа С усиливает проводимость CFTR, модулируя нуклеотид-связывающий домен канала [31], а Ca^{2+} -зависимые тирозинкиназы, ингибируя протеинфосфатазу 2А, предотвращают снижение проводимости CFTR [24]. Поэтому CFTR является подходящей мишенью среди хлорных каналов, которая может опосредовать эффекты стимуляции α -АР в АВУ.

Для целого ряда липофильных производных бензойной кислоты показано блокирующее действие на анионную и хлорную проводимость в электровозбудимых тканях. В экспериментальных работах в качестве блокатора хлорных каналов широко используется 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойная кислота (NPPB, 5-nitro-

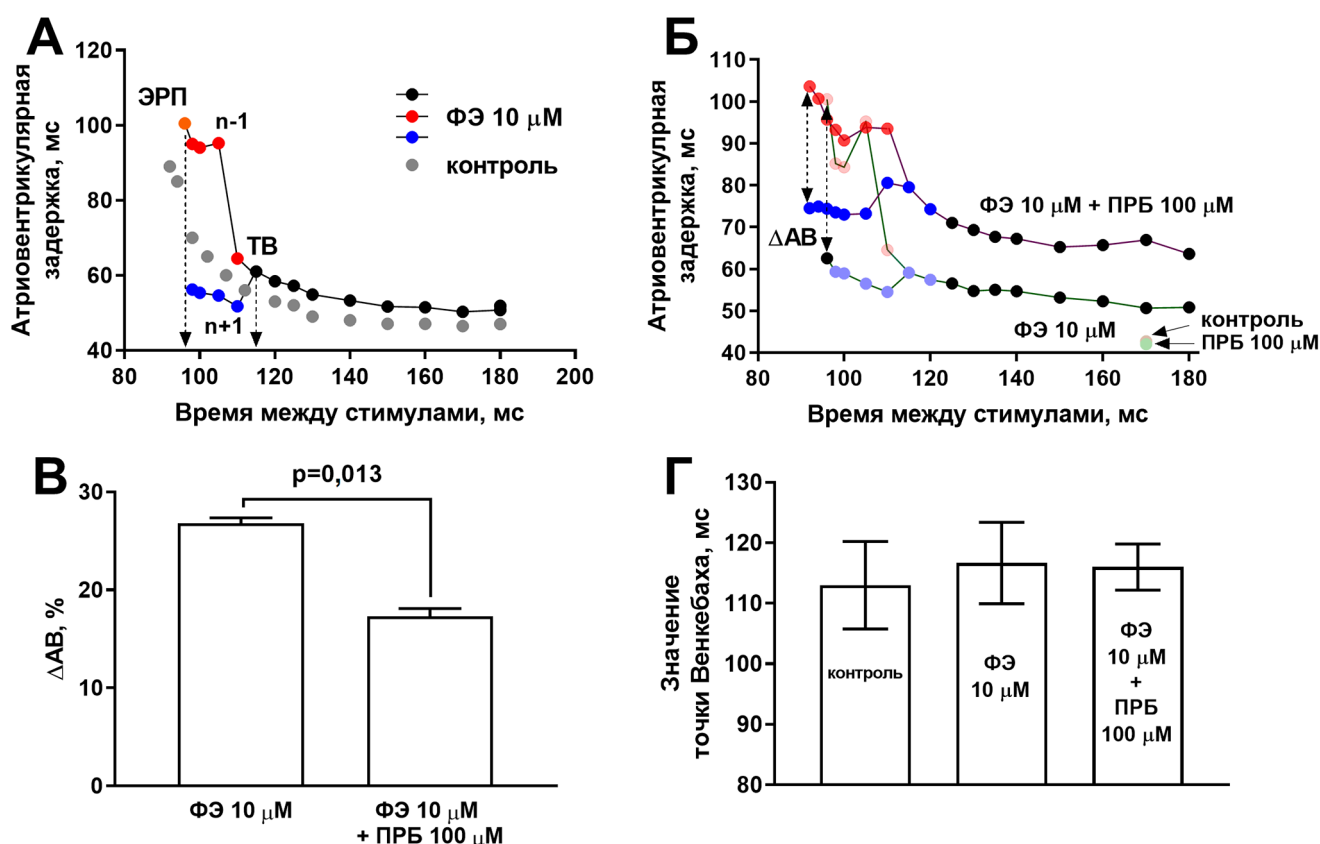


Рис. 3. Влияние пробенецида (ПРБ) на периоду Венкебаха и осцилляции длительности атриовентрикулярной задержки (ABZ), вызванные стимуляцией α_1 -АР фенилэфрином (ФЭ, 10 μM). **А.** Кривая рефрактерности атриовентрикулярного узла при действии ФЭ; ЭРП – эффективный рефрактерный период; ТВ – точка Венкебаха. **Б.** Кривая рефрактерности атриовентрикулярного узла при действии ФЭ и ФЭ на фоне ПРБ (100 μM). **В.** Влияние ПРБ на увеличение ΔAB (величина осцилляций ABZ), вызванное ФЭ. **Г.** Влияние ПРБ на увеличение значения TB, вызванное ФЭ.

2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) [32]. Как указано выше, ПРБ также является производным бензойной кислоты, широко применяемым в фармакологии. Изначально предполагалось, что действие ПРБ связано с ингибированием трансмембранных переносчиков органических анионов, что определило его использование как агента, пролонгирующего и потенцирующего действие антибиотиков [33], а также подавляющего реабсорбцию мочевой кислоты [34]. В настоящее время установлено, что мишенями ПРБ, помимо трансмембранных переносчиков органических анионов, являются некоторые АТФ-связывающие транспортные («кассетные») белки, паннексины [35], $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменник (SLC26A4, пендрин) [36]; установлено также, что ПРБ активирует TRPV2 [37] и является блокатором хлорных каналов [38, 39]. В нескольких работах подтверждено, что ПРБ блокирует CFTR [40, 41].

Несомненным преимуществом ПРБ перед другими соединениями, подавляющими хлорную проводимость, является его доказанная более 70 лет назад эффективность и безопасность [42], что открывает возможность фармакологического использования соединения при установлении новых клинически значимых эффектов.

В наших экспериментах впервые показано, что ПРБ подавляет увеличение ЭРП в АВУ, а также уменьшает величину осцилляций АВЗ, вызванных стимуляцией α_1 -АР. Осцилляции длительности АВЗ обусловлены электрофизиологической гетерогенностью ткани АВУ и отражают, помимо прочего, переключение проводящих путей с разными свойствами в АВУ. Величина ΔAB характеризует вероятность того, что АВУ может стать источником аритмий. Уменьшая амплитуду осцилляций, ПРБ, вероятно, снижает функциональную гетерогенность ткани АВУ, увеличенную при стимуляции

α -АР, а также способствует поддержанию активности «быстрых» внутриузловых проводящих путей. Эти эффекты ПРБ можно рассматривать как антиаритмические.

Важно, что эффекты ПРБ отсутствуют в контрольных условиях и проявляются только при действии ФЭ. Можно предположить, что влияние ПРБ на функциональные показатели АВУ связано с подавлением анионной/хлорной проводимости, увеличение которой вызвано стимуляцией α_1 -АР. Учитывая известные мишени сигнальных путей α_1 -АР в кардиомиоцитах, а также мишени ПРБ, можно предположить, что одним из ключевых звеньев, определяющих наблюдаемые эффекты, является канал CFTR.

Вероятно, *in vivo* влияние ПРБ на электрофизиологические свойства АВУ проявляется либо в условиях чрезмерной активности симпатического отдела вегетативной нервной системы, либо в патологически ремоделированном миокарде, в котором уровень экспрессии α_1 -АР и роль внутриклеточных сигнальных путей этих рецепторов повышена. Такой механизм действия позволяет рассматривать ПРБ в качестве безопасного средства, потенциально предотвращающего возникновение аритмий АВУ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №22-15-00189). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены этической комиссией Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России (№ ЛЭС/01.11.23). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bignolais O., Quang K. Le, Naud P., El Harchi A., Briec F., Piron J., Bourge A., Leoni A.L., Charpentier F., Demolombe S. Early ion-channel remodeling and arrhythmias precede hypertrophy in a mouse model of complete atrioventricular block. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011;51(5):713–721.
2. Zhao X., Sun C., Cao M., Li H. Atrioventricular block can be used as a risk predictor of clinical atrial fibrillation. *Clin. Cardiol.* 2019; 42(4): 452–458.
3. Lee S., Wellens H.J.J., Josephson M.E. Paroxysmal atrioventricular block. *Hear. Rhythm.* 2009;6(8):1229–1234.
4. Kashou A.H., Kashou H.E. *Rhythm, Atrioventricular Block*. StatPearls Publishing; 2018. 324 pp.
5. O'Connell T.D., Jensen B.C., Baker A.J., Simpson P.C. Cardiac α_1 -adrenergic receptors: Novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. *Pharmacol. Rev.* 2014;66(1):308–333.
6. Takata K., Adachi Y.U., Suzuki K., Obata Y., Sato S., Nishiwaki K. Dexmedetomidine-induced atrioven-

tricular block followed by cardiac arrest during atrial pacing: A case report and review of the literature. *J. Anesth.* 2014;28(1):116–120.

7. Spiers J.P., Harron D.W.G., Wilson R., Allen J.D. UK-52,046 (a novel α_1 -adrenoceptor antagonist) and the role of α -adrenoceptor stimulation and blockade on atrioventricular conduction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990;16(5):824–830.

8. Cotecchia S., del Vescovo C.D., Colella M., Caso S., Diviani D. The α_1 -adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: Signaling mechanisms and functional implications. *Cellular Signalling.* 2015;27(10):1984–1993.

9. Одношивкина Ю.Г., Петров А.М. Роль нейромодуляционного соединения в симпатической регуляции сердца. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2021;107(4–5):474–491.

10. Gould D.J., Hill C.E. α -Adrenoceptor activation of a chloride conductance in rat iris arterioles. *Am. J. Physiol. — Hear. Circ. Physiol.* 1996;271(40):2469–2476.

11. Lamb F.S., Kooy N.W., Lewis S.J. Role of Cl^- channels in α -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the anesthetized rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;401(3):403–412.
12. Robert R., Thoreau V., Norez C., Cantereau A., Kitzis A., Mettey Y., Rogier C., Becq F. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel by β -adrenergic agonists and vasoactive intestinal peptide in rat smooth muscle cells and its role in vasorelaxation. *J. Biol. Chem.* 2004;279(20):21160–21168.
13. Robert R., Norez C., Becq F. Disruption of CFTR chloride channel alters mechanical properties and cAMP-dependent Cl^- transport of mouse aortic smooth muscle cells. *J. Physiol.* 2005;568(2):483–495.
14. Adkins G.B., Curtis M.J. Potential role of cardiac chloride channels and transporters as novel therapeutic targets. *Pharmacol. Ther.* 2015;145:67–75.
15. Duan D.D. Phenomics of cardiac chloride channels. *Compr. Physiol.* 2013; 3(2): 667–692.
16. Hume J.R., Duan D., Collier M.L., Yamazaki J., Horowitz B. Anion transport in heart. *Physiol. Rev.* 2000;80(1):31–81.
17. Pustovit K.B., Samoilova D.V., Abramochkin D.V., Filatova T.S., Kuzmin V.S. $\alpha 1$ -adrenergic receptors accompanied by GATA4 expression are related to proarrhythmic conduction and automaticity in rat interatrial septum. *J. Physiol. Biochem.* 2022;78(4):793–805.
18. Egorov Y.V., Kuzmin V.S., Glukhov A.V., Rosenshtaukh L.V. Electrophysiological characteristics, rhythm, disturbances and conduction discontinuities under autonomic stimulation in the rat pulmonary vein myocardium. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2015;26(10):1130–1139.
19. Ivanova A.D., Filatova T.S., Abramochkin D. V., Atkinson A., Dobrzynski H., Kokaeva Z.G., Merzlyak E.M., Pustovit K.B., Kuzmin V.S. Attenuation of inward rectifier potassium current contributes to the $\alpha 1$ -adrenergic receptor-induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium. *Acta Physiol.* 2021;231(4): e13597.
20. Kuzmin V.S., Kamensky A.A. The molecular and cellular mechanisms of heart pacemaker development in vertebrates. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021;76(4):147–164.
21. Saeed Y., Temple I.P., Borbas Z., Atkinson A., Yanni J., Maczewski M., Mackiewicz U., Aly M., Logantha S.J.R.J., Garratt C.J., Dobrzynski H. Structural and functional remodeling of the atrioventricular node with aging in rats: The role of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated and ryanodine 2 channels. *Hear. Rhythm.* 2018;15(5):752–760.
22. Markowitz S.M., Lerman B.B. A contemporary view of atrioventricular nodal physiology. *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 2018;52(3):271–279.
23. Yajima T., Tsutsumi-sakai R., Hagiwara N. Vessels functional activity of the CFTR Cl^- channel in human myocardium. *Hear. Vessel.* 1997;12(6):255–261.
24. Wang Y., Zhao J., Cai Y., Ballard H.J. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent bicarbonate entry controls rat cardiomyocyte ATP release via pannexin1 through mitochondrial signalling and caspase activation. *Acta Physiol.* 2020;230(1):e13495.
25. Sellers Z.M., De Arcangelis V., Xiang Y., Best P.M. Cardiomyocytes with disrupted CFTR function require CaMKII and Ca^{2+} -activated Cl^- channel activity to maintain contraction rate. *J. Physiol.* 2010;588(13):2417–2429.
26. James A.F. Enigmatic variations: The many facets of CFTR function in the heart. *Acta Physiol.* 2020;230(1):e13525.
27. Uramoto H., Okada T., Okada Y. Protective role of cardiac CFTR activation upon early reperfusion against myocardial infarction. *Cell. Physiol. Biochem.* 2012;30(4):1023–1038.
28. Bahinski A., Nairn A.C., Greengard P., Gadsby D.C. Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature.* 1989;340(6236):718–721.
29. Mutlu G.M., Adir Y., Jameel M., Akhmedov A.T., Welch L., Dumasius V., Fan J.M., Zabner J., Koenig C., Lewis E.R., Balagani R., Traver G., Sznajder J.I., Factor P. Interdependency of β -adrenergic receptors and CFTR in regulation of alveolar active Na^+ transport. *Circ. Res.* 2005;96(9):999–1005.
30. Vijftigschild L.A.W., Berkers G., Dekkers J.F., et al. 2-Adrenergic receptor agonists activate CFTR in intestinal organoids and subjects with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2016;48(3):768–779.
31. Chappe V., Hinkson D.A., Zhu T., Chang X.B., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J. Physiol.* 2003;548(1):39–52.
32. Ramteke V.D., Tandan S.K., Kumar D., Aruna Devi R., Shukla M.K., Ravi Prakash V. Increased hyperalgesia by 5-nitro-2, 3-(phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB), a chloride channel blocker in crush injury-induced neuropathic pain in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009;91(3):417–422.
33. Burnell J.M., Kirby W.M. Effectiveness of a new compound, benemid, in elevating serum penicillin concentrations. *J. Clin. Invest.* 1951;30(7):697–700.
34. Talbott J.H., Bishop C., Norcross B.M., Lockie L.M. The clinical and metabolic effects of benemid in patients with gout. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* 1951;64:372–377.
35. Silverman W., Locovei S., Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* 2008;295(3):761–767.
36. Barone S., Xu J., Zahedi K., Brooks M., Soleimani M. Probenecid pre-treatment downregulates the kidney $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (Pendrin) and potentiates hydrochlorothiazide-induced diuresis. *Front. Physiol.* 2018;9:849.
37. Bang S., Kim K.Y., Yoo S., Lee S.H., Hwang S.W. Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci. Lett.* 2007;425(2):120–125.
38. Cloutier M.M. Probenecid affects chloride secretion in canine tracheal epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987;135(6):1329–1333.
39. Diena T., Melani R., Caci E., Pedemonte N., Sondo E., Zegarra-Moran O., Galletta L.J.V. Block of CFTR-dependent chloride currents by inhibitors of multidrug resistance-associated proteins. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;560(2–3):127–131.
40. Hanssens L.S., Duchateau J., Casimir G.J. Cftr protein: Not just a chloride channel? *Cells.* 2021;10(11):2844.
41. Sheppard D.N., Welsh M.J. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological Rev.* 1999;79(1 Suppl.):23–45.
42. McKinney S.E., Peck H.M., Bochey J.M., Byham B.B., Schuchardt G.S., Beyer K.H. Benemid, p-(DI-n-propylsulfamyl)-benzoic acid; toxicologic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1951;102(3):208–214.

Поступила в редакцию 04.07.2023

После доработки 28.11.2023

Принята в печать 29.11.2023

RESEARCH ARTICLE

The effect of probenecid on α_1 -adrenoceptor stimulation induced proarrhythmic conduction in the atrioventricular node of rat heart

Y.A. Voronina^{1,*} , V.S. Kuzmin^{1,2} ¹*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, Russia 119234;*²*Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Centre of Cardiology, Academician Chazov str. 15a, Moscow, Russia 121552***e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru*

Cardiac tissue contains adrenergic receptors (AR) not only of the beta type, but also of the alpha type (α -AR). Both types of ARs play significant role in regulation of cardiomyocytes electrophysiology in different parts of the heart, including the atrioventricular node (AVN). An augmentation of α_1 -AR mediated component of adrenergic signaling results in impaired conduction of excitation in the heart and onset of various rhythm disturbances including AVN-associated arrhythmias. The activation of α_1 -AR facilitates anionic transmembrane transport causing electrophysiological changes in myocytes. Current study is aimed to the investigation of the effects of anion/chloride blockade on α_1 -AR-mediated proarrhythmic alteration of AVN functioning. Functional characteristics of AVN including AVN conduction time, AVN refractoriness and the AVN conduction alterations were examined via recording of surface electrograms in Langendorff-perfused isolated rat heart (Wistar, 250 ± 30 g). Phenylephrine was used as α_1 -AR agonist. Probenecid demonstrating anion/chloride transmembrane conductance blocking activity was used to modify Phe-induced α_1 -AR-mediated effects in AVN. The activation of α_1 -AR by Phe results in a significant increase in the duration of AV intervals ($N = 10$, $p < 0.001$) and effective refractory period (ERP) in the AVN (by $9.8\% \pm 1.2\%$, $n = 10$, $p < 0.001$). Also, Phe induces AV-blocks of conduction and oscillations in atrioventricular delay ($N = 10$) at the stimulation rates close to ERP. Probenecid significantly reduces the magnitude of AVD oscillations during non-stationary conduction in the AV node. In addition, probenecid attenuates ERP prolongation caused by Phe (107 ± 4 ms, $N = 6$) and 114.2 ± 5.35 ms ($N = 10$) in presence of only Phe and Phe with probenecid, respectively, returning its values toward typical for normal conditions. In conclusion, probenecid maintains physiological mode of AVN conduction when α_1 -AR are stimulated. This also suggests that chloride ion channels and anion carriers may contribute to the α_1 -AR-mediated AVN arrhythmias.

Key words: α_1 -adrenergic receptors, atrioventricular node, atrioventricular blocks, probenecid, chloride channels, arrhythmia

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-15-00189.

Сведения об авторах

Воронина Яна Алексеевна — ассистент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6624-7805>

Кузьмин Владислав Стефанович — докт. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ku290381@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3075-4834>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.113.6:546.281+578.282:578.832.1

Олигорибонуклеотид-содержащие наноконструкции на основе наночастиц аминопропилсиланола как эффективные ингибиторы репликации вируса гриппа А

М.Н. Репкова¹ , О.Ю. Мазурков² , Е.И. Филиппова² , М.А. Проценко² ,
Н.А. Мазуркова² , Б.П. Челобанов¹ , А.С. Левина¹ , В.Ф. Зарытова^{1,*}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 8;

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия, Новосибирская область, 630559, Кольцово

*e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru

Наночастицы диоксида титана или аминопропилсиланола являются эффективными средствами доставки олигодезоксирибонуклеотидов и дезоксирибозимов в клетки с целью их воздействия на нуклеиновые кислоты-мишени. В данной работе предложенный принцип доставки осуществлен в отношении олигорибонуклеотидов (ORN). Показано, что полученные ORN-содержащие наноконструкции ($\text{Si-NH}_2\cdot\text{ORN}$) на основе наночастиц аминопропилсиланола (Si-NH_2) проникают в эукариотические клетки. Эти наноконструкции исследованы в качестве агентов для подавления репликации вируса гриппа А в клеточной системе. Показано, что ORN в составе наноконструкции, направленные на (+)РНК и (–)РНК 5-го сегмента вируса гриппа А, понижают титр вируса соответственно на 99,7% и 98,4%. Таким образом, олигорибонуклеотиды в составе наноконструкций ($\text{Si-NH}_2\cdot\text{ORN}$) эффективно ингибируют репликацию вируса гриппа А.

Ключевые слова: олигорибонуклеотиды, наночастицы аминопропилсиланола, наноконструкции, доставка в клетки, вирус гриппа А, противовирусная активность

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-8

Введение

Нуклеиновые кислоты (НК) и их фрагменты (олигонуклеотиды, их производных и аналоги) являются перспективными соединениями, которые могут воздействовать на генетический материал патогенов, унаследованные дефектные гены или гены опухолей. НК плохо проникают в клетки, поэтому для их применения в терапии необходимы эффективные методы доставки.

Для создания систем доставки фрагментов НК в основном используется две стратегии: создание биоконъюгатов олигонуклеотидов и биогенных молекул (пептиды, полимеры, липофильные молекулы и др.) и фиксация олигонуклеотидов на наночастицах. Основной проблемой является низкая биодоступность конъюгатов и неблагоприятная фармакокинетика, что вместе с довольно высокой стоимостью получения таких препаратов в количествах, необходимых для достижения терапевтического эффекта, затрудняет их использование в клинике [1]. Серьезный успех с применением

биоконъюгатов был достигнут в последнее время при использовании конъюгатов siRNA и N-ацетилгалактозамина (GalNAc), которые эффективно доставляются в гепатоциты путем связывания GalNAc с рецепторами печени [2]. В последние годы несколько препаратов siRNA были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США) или находятся на разных стадиях клинических испытаний [3].

Наиболее широко используемый и клинически продвинутый подход к доставке препаратов на основе РНК заключается в конъюгации их с липидными наночастицами [3]. Использование липидных наночастиц сопряжено со значительными затратами [4]. Такие частицы обычно состоят из четырех-пяти компонентов в различных соотношениях с различной токсичностью каждого компонента [5]. Кроме того, предлагаемые частицы вызывают токсические иммунные реакции и/или нецелевые побочные эффекты, приводящие

к провалу клинических испытаний. Безопасность и эффективность остаются жизненно важными для клинического успеха предлагаемых методов доставки фрагментов НК. Таким образом, несмотря на определенные успехи в разработке методов доставки фрагментов НК в клетки, проблему доставки нельзя считать окончательно решенной. Поэтому целесообразным является поиск других способов доставки.

Ранее мы показали, что наночастицы аминопропилсиланола ($\text{Si}\sim\text{NH}_2$) способны доставлять олигодезоксирибонуклеотиды (ODN) в эукариотические клетки [6]. Биологический эффект предложенных наноконструктов продемонстрирован на примере подавления репликации вируса гриппа А (influenza A virus, IAV) *in vitro* [6], а также для коррекции гипертензии на модели крыс НИСАГ (крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией) [7, 8].

Целью данной работы было получение наноконструктов на основе аминопропилсиланола, несущих олигорибонуклеотиды (ORN), которые являются составными частями коротких интерферирующих РНК (siRNA), и изучение их активности против вируса гриппа А в культуре клеток.

Материалы и методы

В работе были использованы: аминопропилтриэтоксисилан (APTES, (3-aminopropyl)triethoxysilane), трипсин, флуоресцеинизотиоцианат, пенициллин, стрептомицин и L-глутамин (Sigma-Aldrich, США); среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium); фетальная телячья сыворотка (Gibco, США); эритроциты петуха, клетки MDCK и HeLa, вирус гриппа А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и куриные эмбрионы (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия).

Олигорибонуклеотиды и их производные синтезировали амидофосфитным методом на ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) с использованием соответствующих мономеров (Glen Research, США). Оптическое поглощение олигорибонуклеотидов измеряли на спектрофотометре Shimadzu U-1800 (Shimadzu, Япония). В работе использовали олигорибонуклеотиды CUCCGAAGAAAUAAGAUC (dT) (ORN_1) и GGAUCUUAUUUCUUCGGAG (dT) (ORN_2).

Синтез наночастиц и наноконструктов. Наночастицы $\text{Si}\sim\text{NH}_2$ синтезированы, как описано ранее [6]. APTES добавляли по каплям в горячую воду, и смесь перемешивали при этой температуре в течение 15 ч с последующим охлаждением до комнатной температуры. Конечная концентрация $\text{Si}\sim\text{NH}_2$ составляла 0,26 М. Размер наночастиц (~1 нм) определяли методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS Plus Instrument (Malvern, Великобритания) в водном растворе. Ранее было показано [7], что полученные наночастицы не склонны к агрегации и могут храниться в течение нескольких месяцев.

Для мечения наночастиц флуоресцентной меткой раствор $\text{Si}\sim\text{NH}_2$ (2 мкмоль) и флуоресцеинизотиоцианат (0,1 мкмоль) в 40 мкл воды выдерживали в течение 1 ч при 60°C и получали частицы аминопропилсиланола, содержащие остаток флуоресцеина ($\text{Si}\sim\text{NH}_2^{\text{Flu}}$) в концентрации 50 мМ по аминогруппам и 2,7 мМ по остатку флуоресцеина (концентрацию последнего оценивали спектрофотометрически с использованием молярного коэффициента поглощения флуоресцеина в максимуме поглощения, $\epsilon_{495} = 74000 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$).

ORN иммобилизовали на наночастицах $\text{Si}\sim\text{NH}_2$ за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными межнуклеотидными фосфатными группами (р) в ORN и положительно заряженными аминогруппами (NH_2) в наночастицах, как описано ранее [6], и получали наноконструкты $\text{Si}\sim\text{NH}_2 \cdot \text{ORN}$ при соотношении $\text{NH}_2/\text{р} = 100$. Наноконструкты $\text{Si}\sim\text{NH}_2 \cdot \text{ORN}_1^{\text{Flu}}$ получали, используя флуоресцентно меченый олигорибонуклеотид $\text{ORN}_1^{\text{Flu}}$.

Выживаемость клеток MDCK при воздействии наночастиц $\text{Si}\sim\text{NH}_2$. Клетки MDCK в логарифмической фазе роста (10^5 кл/мл) рассеивали в 96-луночные планшеты в питательной среде DMEM (100 мкл/луночка) и инкубировали при 37°C и 5% CO_2 . Через 2 сут после образования сплошного монослоя клетки промывали питательной средой без сыворотки (3×200 мкл). Исследуемые образцы наночастиц разбавляли средой DMEM до нужной концентрации (5–100 мМ) и инкубировали с клетками MDCK при 37°C и 5% CO_2 в течение 48 ч. Деструктивные изменения в клетках оценивали с помощью инвертированного микроскопа. Клетки окрашивали трипановым синим [9]; число живых клеток считали в камере Горяева. Максимальную концентрацию веществ, при которой отсутствовали грубые изменения клеток, принимали за максимально переносимую концентрацию (МПК).

Проникновение наночастиц и наноконструктов в клетки. Для конфокальной микроскопии клетки HeLa культивировали в полной среде DMEM в 8-луночных камерах Nunc Lab-Tek Chamber Slide System (Thermo Fisher Scientific, США) до достижения 70%-ного монослоя, после чего полную среду заменяли на среду без сыворотки, содержащую исследуемые флуоресцентно меченые образцы $\text{ORN}_1^{\text{Flu}}$, $\text{Si}\sim\text{NH}_2^{\text{Flu}}$ и $\text{Si}\sim\text{NH}_2 \cdot \text{ORN}_1^{\text{Flu}}$ в концентрации 5 мкМ по остатку флуоресцеина. Концентрацию по остатку флуоресцеина оценивали спектрофотометрически, используя значение $\epsilon_{495} = 74000 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$. После 4 ч инкубации клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали 3,7%-ным формальдегидом, окрашивали красителями Phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich, США) и Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США), наслаивали среду для поддержания флуоресценции Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako, США) и накрывали покровным стеклом. Препараты ана-

лизировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Inc., Германия). Использовали три лазерные линии — с длиной волны 405 нм (для обнаружения ядер клеток), 561 нм (для актиновых микрофиламентов) и 488 нм (для наноконструктов, меченных флуоресцеином). Полученные изображения обрабатывали и анализировали при помощи программы ZEN 2 (Carl Zeiss, Inc., Германия).

Противовирусная активность исследуемых образцов. Вирус гриппа А/Н5N1 выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов при температуре 37°C. Аллантоисную жидкость собирали в течение 48 ч после инокуляции вирусом, делили на части и хранили при температуре –80°C. Клетки MDCK в логарифмической фазе (10^5 кл/мл) высевали в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, США), в 96-луночные планшеты (100 мкл/лунка) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности. После достижения ~80% монослоя среду удаляли, и в лунки добавляли исследуемые образцы ORN и Si~NH₂·ORN (0,1 мкМ по ORN) в 100 мкл среды DMEM. Контрольным образцом была та же среда без образца. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности в течение 4 ч с последующей промывкой клеток той же средой. Затем клетки инфицировали вирусом А/Н5N1 в среде DMEM, содержащей трипсин (2 мкг/мл) (по 100 мкл в каждую лунку), при множественности заражения (MOI) 0,1 ТЦД₅₀/кл. Множественность заражения означает количество ТЦД₅₀ на одну клетку (ТЦД₅₀ — тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток). После 1 ч инкубации при комнатной температуре содержащую вирус среду удаляли и добавляли ту же среду DMEM (100 мкл в каждую лунку). После инкубации в течение 48 ч проводили последовательные десятикратные разведения (от 10⁻¹ до 10⁻⁸) содержащей вирус жидкости из каждой лунки. Полученные растворы (каждое разведение) наносили на 4 лунки с выращенным монослоем клеток MDCK и инкубировали 48 ч для оценки титра вируса. Присутствие вируса определяли по реакции гемагглютинации с 1%-ной суспензией эритроцитов петуха. Титр вируса выражали в единицах logТЦД₅₀/мл.

Результаты и обсуждение

Неагломерированные наночастицы Si~NH₂ синтезированы путем гидролиза APTES. Полученные частицы в виде прозрачного раствора использованы для иммобилизации ORN за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных аминогрупп аминпропилсиланоло с отрицательно заряженными межнуклеотидными фосфатными группами олигорибонуклеотидов. В результате получены наноконструкты Si~NH₂·ORN.

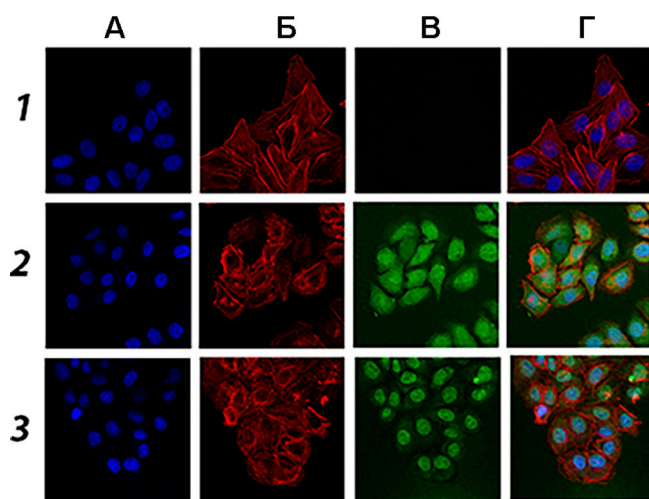


Рис. 1. Конфокальная лазерная флуоресцентная микроскопия клеток HeLa после инкубации в течение 4 ч с (1) ORN₁^{Flu}, (2) Si~NH₂^{Flu}, (3) Si~NH₂·ORN₁^{Flu}. (А) Ядра клеток, окрашенные DAPI (синий канал); (Б) актиновые филаменты, окрашенные Phalloidin-TRITC (красный канал); (В) образцы, меченные флуоресцеином (зеленый канал); (Г) суперпозиция каналов А, Б и В.

В наших предыдущих работах показано, что олигонуклеотид-содержащие наноконструкты на основе наночастиц диоксида титана или аминпропилсиланоло проникают в разные типы эукариотических клеток (MDCK, VERO, HeLa, и A549 human lung adenocarcinoma cells [6, 10, 11]). В данной статье мы использовали клетки HeLa для демонстрации проникновения в клетки наночастиц аминпропилсиланоло и олигорибонуклеотид-содержащих наноконструктов на их основе. На рис. 1 представлены изображения клеток HeLa, полученные с помощью конфокального микроскопа, после их инкубации с флуоресцентно мечеными образцами ORN₁^{Flu}, Si~NH₂^{Flu} и Si~NH₂·ORN₁^{Flu}.

Несвязанные с наночастицами молекулы ORN₁^{Flu} в клетках не детектируются (1 на рис. 1). Флуоресцентно меченные наночастицы равномерно распределяются по всей клетке (2 на рис. 1). Меченные молекулы ORN₁^{Flu}, доставляемые в клетки в виде наноконструкта Si~NH₂·ORN₁^{Flu}, обнаруживаются в основном в ядрах клеток (3 на рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют об успешном использовании наночастиц аминпропилсиланоло в качестве доставщиков ORN в клетки.

Доставка РНК в ядра клеток показана также в других работах. Например, авторы одной из работ [12] для этой цели использовали золотые наночастицы, несущие siRNA и сигнальные пептиды ядерной локализации.

Мы исследовали способность предлагаемых наноконструктов воздействовать на нуклеиновые кислоты-мишени внутри клеток на примере ингибирования репликации IAV. Как и многие другие исследователи [13, 14], мы выбрали сегмент 5 IAV

в качестве мишени для воздействия на репликацию вируса. Этот сегмент кодирует нуклеопротеин, который играет ключевую роль в проникновении вирусного генома в ядра клеток инфицированного организма и, тем самым, обеспечивает дальнейшую репликацию и сборку вирусных частиц. В данной работе мы использовали ORN₁, направленный на кодирующую область вблизи 3'-конца (+)РНК 5-го сегмента IAV (1496–1516 нт), и комплементарный ему ORN₂, направленный на соответствующую область (–)РНК 5-го сегмента IAV. Комплементарные друг другу ORN₁ и ORN₂ являются составными компонентами короткой интерферирующей РНК (siRNA). В ряде работ показано, что упомянутая область 5-го сегмента IAV наиболее чувствительна к воздействию siRNA [13, 15].

Мы оценили МПК наночастиц Si~NH₂, не вызывающую деструкцию используемой культуры клеток MDCK, как 20 мМ. При исследовании противовирусной активности препаратов мы использовали наночастицы и наноконструкции с концентрацией по наночастицам 0,2 мМ, т.е. на 2 порядка меньшую по сравнению МПК.

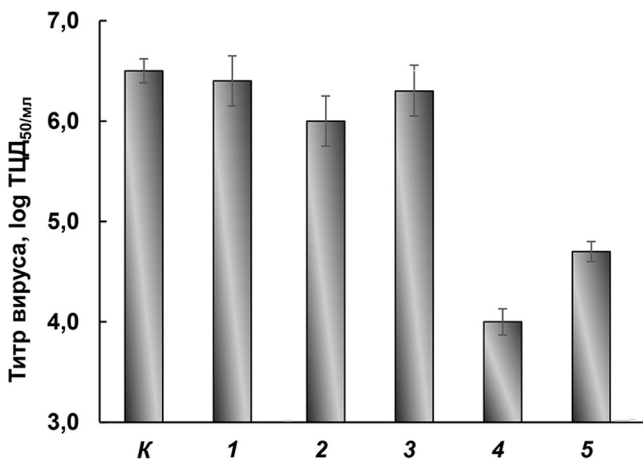


Рис. 2. Противовирусная активность исследуемых образцов. 1 – Si~NH₂; 2 – ORN₁; 3 – ORN₂; 4 – Si~NH₂·ORN₁; 5 – Si~NH₂·ORN₂. К – титр вируса в зараженных клетках без добавления образцов. Концентрация ORN в образцах 0,1 мкМ.

Таблица 1

Противовирусная активность исследуемых образцов				
Образец		logTC ₅₀ /мл	TC ₅₀ /мл	Подавление, % ^{а)}
К	Контроль ^{б)}	6,5 ± 0,12	3162278	
1	Si~NH ₂	6,4 ± 0,25	2511886	20,6
2	ORN ₁	6,0 ± 0,25	1000000	68,4
3	ORN ₂	6,3 ± 0,25	1995262	36,9
4	Si~NH ₂ ·ORN ₁	4,0 ± 0,13	10000	99,7
5	Si~NH ₂ ·ORN ₂	4,7 ± 0,10	50119	98,4

а) Подавление репликации вируса в % вычисляли по формуле: [TC₅₀/мл(контроль) – TC₅₀/мл(образец)]/TC₅₀/мл(контроль).

б) Титр вируса в зараженных клетках без добавления образцов

Мы оценили активность предложенных наноконструкций Si~NH₂·ORN в отношении высокопатогенного вируса гриппа А/Н5N1 и сравнили ее с контрольными образцами (рис. 2, табл. 1).

Титр вируса в клетках после инкубации с наночастицами Si~NH₂ (1, рис. 2) или ORN₁ и ORN₂, не связанными с наночастицами (2 и 3, рис. 2), практически не отличается от контроля. Однако те же олигорибонуклеотиды в составе наноконструкций Si~NH₂·ORN₁ и Si~NH₂·ORN₂ подавляют репликацию вируса на 99,7% и 98,4%, т.е. являются высокоэффективными противовирусными агентами (4 и 5, рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют не только об успешном использовании наночастиц аминопропилсиланола в качестве переносчиков ORN, но и о способности доставленных ORN эффективно взаимодействовать с РНК-мишенями.

Идеальные носители для доставки фрагментов НК должны соответствовать таким критериям, как простота приготовления и модификации (для введения функциональных групп), эффективность иммобилизации НК, высокая биосовместимость, низкая токсичность и высокая эффективность проникновения через клеточную мембрану. Наночастицы диоксида кремния рассматриваются как перспективные носители для доставки нуклеиновых кислот в клетки [16]. Диоксид кремния привлекателен как функциональный, биосовместимый, нетоксичный и инертный материал, который можно легко синтезировать и модифицировать [17]. Использование наночастиц SiO₂ в качестве невирусных нановекторов для доставки плазмидной ДНК и их более низкая токсичность по сравнению с широко используемым трансфекционным агентом липофектамин были показаны ранее [18]. Органически модифицированные наночастицы диоксида кремния известны своей низкой токсичностью и биосовместимостью и могут быть использованы для терапии [19]. Такие наночастицы биоинертны и менее токсичны по сравнению с катионными полимерами, используемыми для доставки НК; они гораздо более стабильны в физиологических условиях, чем липосомы и другие подобные транспортирующие наноконструкции.

Синтез аминосодержащих наночастиц диоксида кремния описан во многих работах [17, 18, 20]. Чаще всего их получают сополимеризацией при гидролизе алкил- (или арил)триэтоксид- (или метокси-) силанов в присутствии аминопропилтриэтоксисилана [17].

Предлагаемый способ доставки олигорибонуклеотидов имеет ряд преимуществ по сравнению с наиболее часто используемыми в настоящее время методами. Синтез наночастиц аминопропилсиланола проще, быстрее и дешевле, чем получение других кремниевых или липидных наночастиц. Используемые наночастицы не агломе-

рируют и представляют собой прозрачный раствор, что может расширить возможности их применения. Они способствуют доставке олигорибонуклеотидов в цитоплазму и ядра клеток без использования дополнительных агентов. Предлагаемые наночастицы $\text{Si} \sim \text{NH}_2$ обладают низкой цитотоксичностью. Олигорибонуклеотид-содержащие наноконплексы на их основе проявляют достаточно высокую биологическую активность, что показано на примере подавления репликации вируса гриппа А.

Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод о целесообразности применения наночастиц аминопропилсиланолола для доставки олигорибонуклеотидов в эукариотические клет-

ки. В работе показано проникновение наноконплексов $\text{Si} \sim \text{NH}_2 \cdot \text{ORN}$ в клетки и их успешное использование для высокоэффективного подавления репликации вируса гриппа А в клеточной системе.

Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов Сибирского отделения Российской академии наук (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00230). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chernikov I.V., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Current development of siRNA bioconjugates: from research to the clinic. *Front. Pharmacol.* 2019;10:444.
- Fabrega C., Aviñó A., Navarro N., Jorge A.F., Grijalvo S., Eritja R. Lipid and peptide-oligonucleotide conjugates for therapeutic purposes: from simple hybrids to complex multifunctional assemblies. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):320.
- Lim S.A., Cox A., Tung M., Chung E.J. Clinical progress of nanomedicine-based RNA therapies. *Bioact. Mater.* 2022;12:203–213.
- Kanasty R., Dorkin J.R., Vegas A., Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* 2013;12(11):967–977.
- Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(14):6518–6548.
- Levina A.S., Repkova M.N., Shikina N.V., Ismagilov Z.R., Yashnik S.A., Semenov D.V., Savinovskaya Y.I., Mazurkova N.A., Pyshnaya I.A., Zarytova V.F. Non-agglomerated silicon-organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: synthesis and properties. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018;9:2516–2525.
- Levina A.S., Repkova M.N., Klimov L.O., Ryazanova M.A., Markel A.L., Zarytova V.F. Antisense oligonucleotides immobilized on silicon-organic nanoparticles as a tool for prolonged correction of hypertensive states. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019;167(1):116–119.
- Levina A., Repkova M., Kupryushkin M., Seryapina A., Shevelev O., Pyshnyi D., Zarytova V. *In vivo* hypotensive effect of aminosilanol-based nanocomposites bearing antisense oligonucleotides. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2022;75:103612.
- Osano E., Kishi J., Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicol. In Vitro.* 2003;17(1):41–47.
- Levina A.S., Ismagilov Z.R., Repkova M.N., Shikina N.V., Baiborodin S.I., Shatskaia N.V., Zagrebel'nyĭ S.N., Zarytova V.F. TiO_2 -DNA nanocomposites capable of penetrating into cells. *Russian J. Bioorg. Chem.* 2013;39(1):77–86.
- Repkova M., Levina A., Chelobanov B., Ismagilov Z., Shatskaya N., Baiborodin S., Filippova E., Mazurkova N., Zarytova V. Efficient inhibition of influenza A viral replication in cells by deoxyribozymes delivered by nanocomposites. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2017;49(6):703–708.
- Li N., Yang H., Yu Z., Li Y., Pan W., Wang H., Tang B. Nuclear-targeted siRNA delivery for long-term gene silencing. *Chem. Sci.* 2017;8(4):2816–2822.
- Ge Q., Pastey M., Kobasa D., Puthavathana P., Lupfer C., Bestwick R.K., Iversen P.L., Chen J., Stein D.A. Inhibition of multiple subtypes of influenza A virus in cell cultures with morpholino oligomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(11):3724–3733.
- Zhang T., Wang T., Zhao P., Liang M., Gao Y., Yang S., Qin C., Wang C., Xia X. Antisense oligonucleotides targeting the RNA binding region of the NP gene inhibit replication of highly pathogenic avian influenza virus H5N. *Int. Immunopharmacol.* 2011;11(12):2057–2061.
- Stoppani E., Bassi I., Dotti S., Lizier M., Ferrari M., Lucchini F. Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits *in vitro* replication of different influenza A virus strains of avian and swine origin. *Antiviral Res.* 2015;120:16–22.
- Liu Y., Lou C., Yang H., Shi M., Miyoshi H. Silica nanoparticles as promising drug/gene delivery carriers and fluorescent nano-probes: recent advances. *Curr. Cancer Drug Targets* 2011;11(2):156–163.
- Liberman A., Mendez N., Trogler W.C., Kummel A.C. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surf. Sci. Rep.* 2014;69(2–3):132–158.
- Cheang T.Y., Tang B., Xu A.W., Chang G.Q., Hu Z.J., He W.L., Xing Z.H., Xu J.B., Wang M., Wang S.M. Promising plasmid DNA vector based on APTES-modified silica nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine.* 2012;7:1061–1067.
- Mahajan S.D., Law W.C., Aalink R., Reynolds J.L., Nair B.B., Sykes D.E., Yong K.T., Roy I., Prasad P.N., Schwartz S.A. Anti-HIV-1 nanotherapeutics: promises and challenges for the future. *Int. J. Nanomed.* 2012;7:5301–5314.
- Chen G., Roy I., Yang C., Prasad P.N. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. *Chem. Rev.* 2016;116(5):2826–2885.

Поступила в редакцию 25.09.2023

После доработки 25.01.2024

Принята в печать 01.02.2024

RESEARCH ARTICLE

Oligoribonucleotide-containing nanocomplexes based on aminopropylsilanol nanoparticles as effective inhibitors of influenza A virus replication

M.N. Repkova¹ , O.Yu. Mazurkov² , E.I. Filippova² , M.A. Prochenko² ,
N.A. Mazurkova² , B.P. Chelobanov¹ , A.S. Levina¹ , V.F. Zarytova^{1, *} 

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
8 Lavrent'eva pr., Novosibirsk, 630090, Russia;*

²*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector," Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia
e-mail: asl1032@yandex.ru

Titanium dioxide or aminopropylsilanol nanoparticles were shown to be effective vehicles for delivering oligodeoxyribonucleotides and deoxyribozymes to cells to affect target nucleic acids. In this paper, the proposed principle of the delivery has been implemented in relation to oligoribonucleotides (ORN), components of short interfering RNAs (siRNAs). It has been shown that the obtained ORN-containing nanocomplexes (Si~NH₂·ORN) based on aminopropylsilanol nanoparticles penetrate eukaryotic cells. These nanocomplexes have been investigated as agents for suppressing the replication of influenza A virus (IAV) in the cellular system. It has been shown that the ORN strands targeted to (+)RNA and (–)RNA of the IAV 5th segment reduces the titer of the virus by 99.7% and 98.4%, respectively. Thus, oligoribonucleotides in the Si~NH₂·ORN nanocomplexes effectively inhibit the replication of the influenza A virus.

Keywords: oligoribonucleotides, aminopropylsilanol nanoparticles, nanocomplexes, cell delivery, influenza A virus, antiviral activity

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 23-25-00230.

Сведения об авторах

Репкова Марина Николаевна — канд. хим. наук, науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: repk56@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7108-9036>

Мазурков Олег Юрьевич — канд. биол. наук, науч. сотр. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: mazurkov_oleg@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Филиппова Екатерина Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: filippova.ekaterina.89@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9554-4462>

Проценко Мария Анатольевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: mpbiotech@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1005-7588>

Мазуркова Наталья Алексеевна — докт. биол. наук, зав. лаб. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: mazurkova@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Челобанов Борис Павлович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: boris.p.chelobanov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2958-2580>

Левина Ася Сауловна — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: asl1032@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2423-3805>

Зарытова Валентина Филипповна — докт. хим. наук, гл. науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9579-9972>



Влияние различных сахарозаменителей на содержание гликогена лейкоцитов крови и состав лейкоцитарной формулы у мышей C57BL/6

А.Г. Кижина^{1,*} , М.С. Машинская² , Э.В. Панова^{1,2} , В.В. Илюха²

¹Институт биологии Карельского научного центра, Российская академия наук, Федеральный исследовательский центр «КарНЦ РАН», 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11;

²Петрозаводский государственный университет, 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33

*e-mail: golubewa81@yandex.ru

Изучали влияние экстракта листьев стевии, сахарината и цикламата в различных дозировках на содержание гликогена лейкоцитов крови у мышей C57BL/6, как необходимого субстрата для осуществления фагоцитарных реакций. Установлено увеличение содержания гликогена во всех экспериментальных группах, получавших заменители сахара в дозировке 10 мг/г массы тела. Влияние сахарозаменителей на состав лейкоцитарной формулы было выявлено только для мышей, получавших экстракт листьев стевии в дозировке 10 мг/г массы тела, и заключалось в повышении соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (Нф/Лф). Полученные данные расширяют представления о метаболизме заменителей сахара в организме и их влиянии на физиологические системы — в частности, на гемопоэтическую и иммунную.

Ключевые слова: экстракт листьев стевии, сахаринат, цикламат, гликоген, лейкоциты, мыши C57BL/6

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-6

Введение

Широкое применение различных сахарозаменителей в последние десятилетия вызвано стремлением сократить потребление рафинированного сахара и снизить связанные с ним риски для здоровья (повреждение зубной эмали, чрезмерная секреция инсулина, развитие ожирения и др.). Однако, несмотря на популярность некоторых заменителей сахара и имеющиеся свидетельства в пользу их безопасности и даже эффективности при лечении метаболических расстройств [1, 2], вопрос о последствиях их воздействия на различные физиологические системы и организм в целом остается открытым. Так, сведения о возможном влиянии употребления сахарозаменителей на свойства иммунокомпетентных клеток и функционирование иммунной системы фрагментарны и нуждаются в дополнении.

На примере фруктозы [3], сахарозы и аспартама [4] показано, что одним из нарушений углеводного обмена при приеме подсластителей является

угнетение синтеза гликогена печени. В лейкоцитах гликоген служит основным запасующим субстратом, необходимым для энергетического обеспечения реакций неспецифического иммунитета. Накопление достаточного количества гликогена лейкоцитами требуется для эффективного осуществления фагоцитарных реакций [5]. Ослабление фагоцитоза в отношении различных возбудителей было показано как у больных сахарным диабетом, так и у моделей генетически запрограммированного сахарного диабета 2-го типа (db/db мыши) [6]. Немаловажным является тот факт, что одним из нарушений при развитии диабета является дефект метаболизма глюкозы и как следствие снижение синтеза гликогена в печени [7].

С учетом этого представляется актуальным изучение содержания гликогена в лейкоцитах при приеме искусственных и натуральных заменителей сахара. Также одним из описанных эффектов влияния потребления сахарозаменителей на иммунологические параметры является изменение

уровня про- и противовоспалительных цитокинов [8], что может оказывать модулирующее действие на пролиферацию и дифференцировку различных типов лейкоцитов.

Целью настоящего исследования являлось сравнительное исследование содержания гликогена в лейкоцитах периферической крови, а также количества различных типов лейкоцитов у мышей C57BL/6 при приеме некоторых сахарозаменителей.

Материалы и методы

Работа проводилась на самках лабораторных мышей инбредной линии C57BL/6 в возрасте от 1,5 мес., содержащихся в виварии Петрозаводского государственного университета при стандартных условиях. Экспериментальные животные были разбиты на 7 групп: 1-я — контрольная ($n = 6$), получавшая очищенную питьевую воду, и 6 других, которые взамен питьевой воды потребляли водные растворы различных сахарозаменителей — экстракта листьев стевии (ЭЛС) в дозе 1 мг/г массы тела (2-я группа, $n = 9$), ЭЛС в дозе 10 мг/г массы тела (3-я группа, $n = 10$), сахарината в дозе 1 мг/г массы тела (4-я группа, $n = 8$), сахарината в дозе 10 мг/г массы тела (5-я группа, $n = 10$), цикламата в дозе 1 мг/г массы тела (6-я группа, $n = 7$), цикламата в дозе 10 мг/г массы тела (7-я группа, $n = 9$). Расчет дозировки 1 мг/г производился исходя из рекомендаций производителей, учитывая массу тела экспериментальных животных при коэффициенте безопасности 100, а для усиления эффекта допустимую суточную дозу каждого заменителя сахара увеличили в 10 раз, что составило 10 мг/г. Эксперимент длился 8 нед., на протяжении которых все животные получали экструдированно-гранулированный корм ЛБК-120 (Профгрызун, Россия), а также воду или водные растворы заменителей сахара без ограничения. Поение животных было свободное, при этом количество потребляемых сахарозаменителей во всех группах было постоянным, так как концентрация растворов корректировалась с учетом количества потребляемой жидкости и изменения веса животных. Определяли массу тела мышей, наблюдали за их внешним видом и активностью.

По окончании эксперимента мышей декапировали в утренние часы, полученную кровь использовали для анализа содержания глюкозы глюкозооксидазным методом, а также для приготовления мазков. Для определения содержания глюкозы в крови использовался набор реагентов «КлиниТест-Глюкоза» (Эко-Сервис, Россия). Анализ проводился на многорежимном планшетном считывателе SpectraMax i3x (Molecular Devices, США). Мазки крови окрашивались гематологическими красителями по Паппенгейму для определения соотношения различных типов лейкоцитов и методом ШИК-реакции (реакция с ре-

активом Шиффа — йодной кислотой) для выявления содержания лейкоцитарного гликогена.

Окрашенные мазки исследовали при помощи светового микроскопа Axioscop 40, (Zeiss, Германия). Цифровые микрофотографии гликоген-позитивных лейкоцитов от каждого животного анализировали с использованием программного обеспечения для анализа изображений ВидеоТест 4.0 (ВидеоТест, Россия). Автоматически измеряли морфометрические и оптические характеристики: общую площадь продукта цитохимической реакции в клетках и его оптическую плотность. Содержание гликогена оценивали по интенсивности цитохимического показателя, который представляет собой произведение двух этих параметров.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с использованием MS Excel и Statgraphics plus 5.0. Для проверки групп на нормальность распределения был использован критерий Колмогорова-Смирнова. Для сравнения групп, в связи с отсутствием нормальности распределения показателей был выбран непараметрический U-критерий Манна-Уитни для малых выборок, с учетом поправки на множественность сравнений FDR (false discovery rate). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Лабораторные исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

По результатам цитохимического исследования установлено, что гликоген выявляется преимущественно в нейтрофильных лейкоцитах. Содержание гликогена, которое оценивалось по интегральному цитохимическому показателю, было не одинаковым среди экспериментальных групп. Более высокие его значения установлены у опытных животных, потреблявших концентрированные растворы сахарозаменителей (рис. 1). При этом значительных изменений в содержании глюкозы крови при приеме всех трех сахарозаменителей выявлено не было (табл. 1). Накопленный на сегодняшний день объем данных указывает на существование противоречий относительно метаболизма глюкозы, а также синтеза инсулина и глюкагона при приеме сахарозаменителей. Роберт Такер и Ши-Ен Тан [9] приводят результаты более 10 исследований, которые показывают, что употребление различных заменителей сахара, включая ЭЛС и сахарината, не оказало существенного влияния на уровень глюкозы.

Наш эксперимент показал, что, не смотря на отсутствие различий в уровне глюкозы крови у исследуемых животных, содержание гликогена су-

щественно возрастало при приеме сахарозаменителей в дозировке 10 мг/г. Увеличение уровня гликогена в клетках печени было установлено у крыс получавших водный раствор листьев стевии в различных дозировках [10]. Одной из возможных причин увеличения содержания гликогена является усиление секреции инсулина под влиянием сахарозаменителей. Согласно данным ряда исследователей сахаринат, цикламат и стевизид повышают уровень инсулина за счет воздействия на β-клетки поджелудочной железы [11, 12]. В другой работе было показано, что синтетические подсластители увеличивают доступность глюкозы для организма за счет усиления ее абсорбции путем активации транспортных белков SGLT1 и GLUT2 [13].

Установленное увеличение содержания гликогена в нейтрофильных лейкоцитах, может рассматриваться как положительный эффект влияния сахарозаменителей, так как накопление гликогена в достаточном количестве является необходимым условием эффективного фагоцитоза, даже при обилии внеклеточной глюкозы [5]. Иммуномодулирующие свойства сахарозаменителей, на примере ЭЛС были продемонстрированы и в другом исследовании, где при его введении

у мышей значительно увеличилась фагоцитарная активность макрофагов селезенки [14].

Результаты нашего эксперимента показали, что потребление сахарозаменителей не влияет на относительное содержание различных типов лейкоцитов периферической крови (рис. 2), но при этом установлено возрастание нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения (Нф/Лф) при приеме ЭЛС в дозировке 10 мг/г (рис. 3). Мыши, как и большинство грызунов, имеют эволюционно сложившийся лимфоцитарный профиль крови, и количество нейтрофильных лейкоцитов у них невелико. Повышение нейтрофилов по отношению к лимфоцитам крови в большинстве случаев рассматривается как неблагоприятный признак, который может указывать на наличие системного воспаления или хронического стресса у животных, в том числе человека [15, 16]. Найденное увеличение Нф/Лф может быть связано с перераспределением про- и противовоспалительных цитокинов при приеме ЭЛС в высокой дозировке [17]. Надо отметить, что в нашем эксперименте животные, получавшие ЭЛС в высокой концентрации – единственная группа, у которой отмечалась отрицательная динамика массы тела (табл. 1).

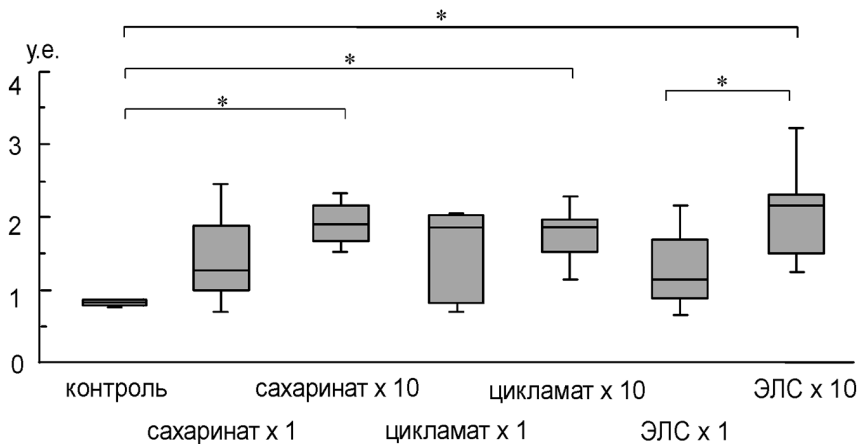


Рис. 1. Содержание гликогена в нейтрофильных лейкоцитах у мышей C57BL/6, получавших различные сахарозаменители. Здесь и на рис. 3 представлены значения медиан (горизонтальная черта), границ квартилей, а также максимальные и минимальные значения (вертикальная черта) в анализируемых выборках. * – различия значимы, $p < 0,05$.

Таблица 1

Влияние различных сахарозаменителей на содержание глюкозы в плазме крови и прирост массы тела у мышей C57BL/6

Параметры	Экспериментальные группы						
	1	2	3	4	5	6	7
Содержание глюкозы, ммоль/л	7,1±0,8	6,0±0,9	7,0±1,8	6,5±0,4	5,2±0,8	7,0±1,3	5,6±2,0
Прирост массы тела, г	0,6±1,4	0,5±1,0	-0,3±1,5*^	2,4±2,6*	0,4±0,6^	0,7±1,8	0,5±1,5

Экспериментальные группы: 1 – контроль, 2 – ЭЛС (1 мг/г), 3 – ЭЛС (10 мг/г), 4 – сахаринат (1 мг/г), 5 – сахаринат (10 мг/г), 6 – цикламат (1 мг/г), 7 – цикламат (10 мг/г)

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, * – различия значимы по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$; ^ – по сравнению с группой, потреблявшей тот же сахарозаменитель в дозировке 1 мг/г веса мыши, $p < 0,05$.

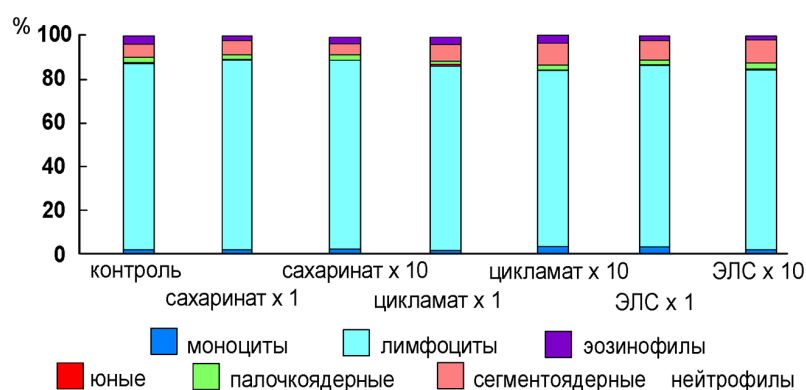


Рис. 2. Состав лейкоцитарной формулы у мышей C57BL/6, получавших различные сахарозаменители.

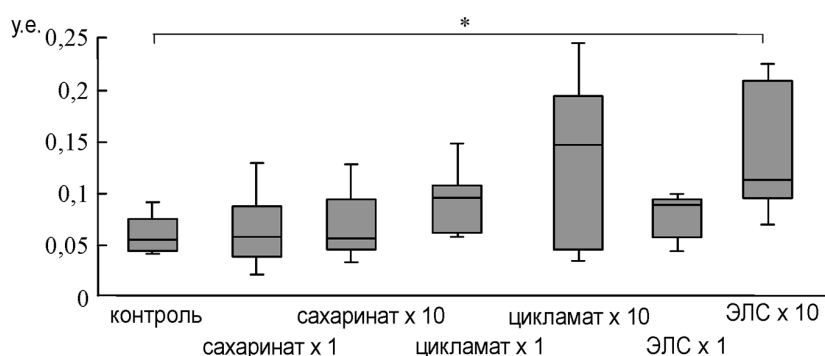


Рис. 3. Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов у мышей C57BL/6, получавших различные сахарозаменители.

Таким образом, впервые были получены сведения об изменении содержания гликогена в лейкоцитах крови под влиянием различных сахарозаменителей. Установлено, что только высокие концентрации вызывают значимое увеличение содержания этого полисахарида; а для ЭЛС в дозе 10 мг/г также показано влияние на Нф/Лф. Новые данные расширяют представления о метаболизме заменителей сахара в организме и их влиянии на физиологические системы — в частности, на гемопоэтическую и иммунную.

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0003). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Комиссией по биоэтике Института биологии КарНЦ РАН (протокол №4 от 04.10.2021). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Авторы выражают благодарность за участие в осуществлении эксперимента сотрудника Петрозаводского государственного университета к.б.н. Зыкину Н.С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramesh B., Pugalendi K.V. Anti-hyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin diabetic rats. *J. Med. Food.* 2006;9(4):562–566.
2. Jan S.A., Habib N., Shinwari Z.K., Ali M., Ali N. The anti-diabetic activities of natural sweetener plant Stevia: an updated review. *SN Appl. Sci.* 2021;3:517.
3. Vrána A., Fábry P., Kazdová L., Zvolanková K. Effect of the type and proportion of dietary carbohydrate on serum glucose levels and liver and muscle glycogen synthesis in the rat. *Nutr. Metab.* 1978;2(5):313–320.
4. El-Shinnawy N.A., Abd Elmageid S.A. Comparative studies on the effect of aspartame (artificial sweetener) and stevia (natural sweetener) on liver of male albino rat. *J. Sci. Res. Sci.* 2017;34(1):33–58.
5. Weisdorf D.J., Craddock P.R., Jacob H.S. Glycogenolysis versus glucose transport in human granulocytes: differential activation in phagocytosis and chemotaxis. *Blood.* 1982;60(4):888–893.
6. Dowey R., Iqbal A., Heller S.R., Sabroe I., Prince L.R. A bittersweet response to infection in diabetes; targeting neutrophils to modify inflammation and improve host immunity. *Front. Immunol.* 2021;12:678771.
7. Krssak M., Brehm A., Bernroider E., Anderwald C., Nowotny P., Man C.D., Cobelli C., Cline G.W., Shulman G.I., Waldhäusl W., Roden M. Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53(12):3048–3056.
8. Rahiman F., Pool E.J. The *in vitro* effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. *J. Immunoassay Immunochem.* 2014;35(1):26–36.
9. Tucker R.M., Tan S.Y. Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol. Behav.* 2017;182:17–26.
10. Ahmad U., Ahmad R.S. Anti diabetic property of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves in

Streptozotocin-induced diabetes in albino rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 2018;18(1):179.

11. Mora M.R., Dando R. The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners. *Compr. Rev. Food Saf.* 2021;20(2):1554–1583.

12. Jeppesen P.B., Gregersen S., Poulsen C.R., Hermansen K. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism.* 2000;49(2):208–214.

13. Moriconi E., Feraco A., Marzolla V., Infante M., Lombardo M., Fabbri A., Caprio M. Neuroendocrine and metabolic effects of low-calorie and non-calorie sweeteners. *Front. Endocrinol.* 2020;11:444.

14. Sehar I., Kaul A., Bani S., Pal H.C., Saxena A.K. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem. Biol. Interact.* 2008;173(2):115–121.

15. Gwak M, Choi S, Kim J, Kim T, Lee S, Park J., Kim H.M. Effects of gender on white blood cell populations and neutrophil–lymphocyte ratio following gastrectomy in patients with stomach cancer. *J. Korean. Med. Sci.* 2007;22(Suppl):S104–S108.

16. Stull C.L., Rodiek A.V. Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. *J. Anim. Sci.* 2000;78(6):1458–1466.

17. Farid A., Hesham M., El-Dewak M., Amin A. The hidden hazardous effects of stevia and sucralose consumption in male and female albino mice in comparison to sucrose. *Saudi Pharm. J.* 2020;28(10):1290–1300.

Поступила в редакцию 08.08.2023

После доработки 18.01.2024

Принята в печать 22.01.2024

SHORT COMMUNICATION

Effect of different sweeteners on glycogen content of blood leukocytes and differential leukocyte counts in C57BL/6 mice

A.G. Kizhina^{1,*} , M.S. Mashinskas² , E.V. Panova^{1,2} , V.V. Ilyukha² 

¹Institute of Biology of the Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya str. 11, Petrozavodsk, 185910, Russia;

²Petrozavodsk State University, Lenina str. 33, Petrozavodsk, 185910, Russia

*e-mail: golubewa81@yandex.ru

We studied the effect of stevia leaf extract, saccharinate and cyclamate in various dosages on the glycogen content of blood leukocytes in mice, as a necessary substrate for the realization of phagocytosis. An increase of glycogen content was found in all experimental groups which obtained sweeteners at a dosage of 10 mg/g of body weight. The effect of sweeteners on the differential leukocyte counts was found only for mice treated with stevia leaf extract at a dosage of 10 mg/g of body weight. They demonstrated increase of neutrophil-to-lymphocyte ratio. New data expand our understanding of the metabolism of sugar substitutes in the organism and their effect on physiological systems, in particular the hematopoietic and immune systems.

Keywords: *stevia leaf extract, saccharinate, cyclamate, glycogen, leukocytes, C57BL/6 mice*

Funding: The work was supported by state order [FMEN-2022-0003] of Karelian Research Centre RAS (Institute of Biology).

Сведения об авторах

Кижина Александра Геннадьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07, e-mail: golubewa81@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3042-8617>

Машинкас Максим Сергеевич — магистрант Института биологии, экологии и агротехнологий Петрозаводского государственного университета. Тел.: 8-8142-57-31-07, e-mail: lobovich17@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9986-5647>

Панова Элина Валерьевна — ведущий биолог Института биологии Карельского научного центра РАН, магистрант Института биологии, экологии и агротехнологий Петрозаводского государственного университета. Тел.: 8-8142-57-31-07, e-mail: panova550@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1124-3489>

Илюха Владимир Викторович — канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института им. профес. А.П. Зильбера Петрозаводского государственного университета. Тел.: 8-8142-79-53-22, e-mail: karax911@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2371-1740>



Препараты с сенолитической активностью: перспективы и возможные ограничения

Г.В. Моргунова*, 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: morgunova@mail.bio.msu.ru*

Поиск и тестирование препаратов с сенолитической активностью являются одними из новых направлений в геронтологии. Увеличивающееся с возрастом количество «сенесцентных» клеток способствует развитию возрастных болезней и хронического неинфекционного воспаления. Удаление «сенесцентных» клеток или подавление их влияния на окружающие ткани кажется логичным шагом для улучшения качества жизни и, возможно, ее продления. Однако препараты, обладающие сенолитической и сеноморфической активностью в модельных системах, в клинических испытаниях вызывают развитие ряда побочных эффектов. В настоящем обзоре мы рассматриваем основные достижения в области сенотерапии, перспективы применения сенотерапевтических препаратов и ограничения, с которыми могут столкнуться исследователи и клиницисты.

Ключевые слова: старение, клеточные культуры, биомаркеры старения, сенолитики, сеноморфики, цитогеронтология

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

Список сокращений:

17-DMAG – 17-диметиламиноэтиламино-17-деметоксигелданамицин (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin); Bcl-2 – регулятор апоптоза, от «В-клеточная лимфома 2» (B-cell lymphoma 2); DDR – реакция на повреждение ДНК (DNA damage response); FOXO4 – член семейства транскрипционных факторов forkhead подкласса O (member of the forkhead family of transcription factors in O subclass); HSP90 – белок теплового шока 90 (heat shock protein 90); IL-6 – интерлейкин 6 (interleukin 6); IL-8 – интерлейкин 8 (interleukin 8); JAK – Янус-киназа (Janus kinase); Ki67 (MKI67) – маркер пролиферации Kiel 67 (marker of proliferation Kiel 67); NF-κB – ядерный фактор каппа В (nuclear factor kappa B); PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (phosphatidylinositol 3-kinase); SASP – ассоциированный со старением секреторный фенотип (senescence-associated secretory phenotype); SCAPs – антиапоптотические пути «сенесцентных» клеток (senescent cell anti-apoptotic pathways); SIPS – стресс-индуцированное преждевременное старение (stress-induced premature senescence); SRC – тирозиновая протеинкиназа, от «саркома» (sarcoma); SSK1 – специфическое для уничтожения «сенесцентных» клеток соединение 1 (senescence-specific killing compound 1); STAT – транскрипционный фактор,

от «преобразователь сигнала и активатор транскрипции» (signal transducer and activator of transcription); TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor); USP7 – убиквитин-специфическая протеаза 7 (ubiquitin-specific protease 7); семейство белков BET – семейство белков, содержащих бромодомен и экстратерминальный домен (bromodomain and extra-terminal domain).

Введение

Сенотерапевтические (от лат. *senile* – старческий, дряхлый) препараты приобрели большую популярность менее чем десять лет назад [1–6]. В настоящий момент проводятся не только доклинические исследования на разных клеточных и животных моделях, но и первые фазы клинических испытаний [5, 7]. С возрастом в организме увеличивается количество «сенесцентных» клеток, которые вследствие повреждений приобретают ассоциированный со старением секреторный фенотип (SASP, senescence-associated secretory phenotype) и выделяют в окружающие ткани провоспалительные факторы, способствуя тем самым развитию возрастных болезней и хронического неинфекционного воспаления (inflammaging) [3, 8–10]. Устранение хронического воспаления путем удаления таких клеток или подавления их влияния на окру-

жающие ткани кажется логичным шагом для улучшения качества жизни и, возможно, ее продления [1, 3, 5, 11]. Однако прицельное удаление именно «сенесцентных» клеток — совсем не простая задача. В настоящем обзоре мы рассмотрим основные достижения в области сенотерапии, перспективы применения сенотерапевтических препаратов и ограничения, с которыми могут столкнуться исследователи и клиницисты.

«Сенесцентные» клетки

Термин «cell senescence» был введен Леонардом Хейфликом [12, 13] для описания «возрастных» изменений, происходящих в нормальных эукариотических клетках при старении *in vitro*, но затем это понятие стало использоваться в отношении любых клеток, а главной чертой «cell senescence» стало проявление биомаркеров старения и развитие SASP [14]. В экспериментах Хейфлика подразумевалось, что клетки становятся «сенесцентными» из-за внутренних изменений, однако позже, на фоне развития модели стресс-индуцированного преждевременного старения (SIPS, stress-induced premature senescence), в рамках которой клетки подвергают воздействию повреждающих факторов, вследствие чего они перестают делиться и приобретают SASP [15], понятие «cell senescence» изменилось.

Изначально концепция строилась вокруг понятия DDR (реакция на повреждение ДНК, DNA damage response), но в настоящее время стало очевидно, что повреждаются самые разные компоненты клетки, не только ДНК. Для исследований используют, как правило, клетки млекопитающих и человека. О том, стали ли клетки «сенесцентными», судят по биомаркерам старения [16], наиболее популярными из которых являются проявление активности ассоциированной со старением бета-галактозидазы, повышенная экспрессия белков p53/p21 и провоспалительных цитокинов (в первую очередь, IL-6 или IL-8), а также изменение ряда других показателей (TNF, NF- κ B, LaminB1, Ki67 и др.).

Термин «cell aging», используемый в работах на дрожжах, имеет другое значение. При хронологическом старении дрожжей строят кривые выживания, как и в исследованиях на животных [17–19], в то время как в экспериментах по изучению «cell senescence» опираются исключительно на проявление биомаркеров старения. Как и в случае с популяциями организмов, для популяции клеток также характерны понятия «aging» и «senescence» [20, 21]. «Aging» является более долгим процессом, на поздних этапах популяция клеток становится гетерогенной, при этом чаще встречаются клетки в «сенесцентном» состоянии. Как было сказано выше, такие клетки выделяют провоспалительные факторы в окружающую их среду, вызывая повреждение соседних клеток

и тканей и способствуя распространению SASP. Удаление «сенесцентных» клеток с помощью сенолитиков или подавление SASP должны способствовать восстановлению тканей, при этом предполагается, что таким способом можно оказывать влияние на фундаментальный процесс старения, вследствие чего будет увеличена продолжительность жизни и отсрочено проявление целого ряда возрастных расстройств [3, 22, 23].

У клетки, в которой после воздействия повреждающих факторов возникли нарушения, есть несколько путей [24]. Она может перейти в состояние аутофагии и в некоторых случаях восстановиться либо должна перейти в состояние апоптоза и погибнуть. Однако некоторые клетки не погибают, а вместо этого переходят в «сенесцентное» состояние и живут еще продолжительное время. Кроме того, существует альтернативный путь — клетка может стать раковой. В концепции Джудит Кампизи предполагалось, что клетки, ставшие «сенесцентными», «спасают» организм от рака, так как они выбрали другой путь — «состариться». Так и называлась статья Д. Кампизи — «Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors», т.е., не приводя организм к гибели из-за рака, «сенесцентные» клетки, тем не менее, ухудшают состояние окружающих тканей и провоцируют еще большее развитие SASP [25]. Однако сейчас стало понятно, что секреция «сенесцентными» клетками провоспалительных факторов сама по себе способствует развитию опухолей, особенно в пожилом возрасте [26]. У раковых и «сенесцентных» клеток есть важная общая черта — они не погибли от воздействия повреждающего фактора и смогли уйти от апоптоза за счет способности подавлять апоптотические пути. Именно это послужило началом поиска первых сенолитиков — препаратов, направленных на антиапоптотические пути «сенесцентных» клеток (senescent cell anti-apoptotic pathways, SCAPs), которые они используют для выживания [5, 27].

Разные способы сенолиза

На сегодняшний день насчитывается, как минимум, семь классов соединений [3, 28], проявляющих признаки сенолитической активности. Классов может быть и больше, так как разные исследователи по-разному делят такие препараты на группы. К сенолитикам относятся ингибиторы тирозинкиназ, фосфоинозитид-3-киназы (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase), белков семейства Bcl-2, белков теплового шока и белков семейства BET (bromodomain and extra-terminal domain; белков с бромодоменом и втерминальным доменом), а также природные полифенолы, антибиотики, стабилизаторы p53, противораковые препараты, сердечные стероиды и т.д. [29]. Джеймс Кирклэнд и его коллеги часто разделяют сенолитики на поколения [5].

К сенолитикам первого поколения относятся дазатиниб (ингибитор тирозинкиназ семейства SRC) и используемый с ним в комплексе природный флавоноид кверцетин. Выбор сенолитиков первого поколения был сделан на основе ряда положений — нацеленность одновременно на несколько разных антиапоптотических путей, природное происхождение, наличие одобрения Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, Food and Drug Administration) [5].

В ранних работах было выдвинуто предположение, что воздействие только одного препарата будет слишком специфичным и затронет лишь один или несколько типов клеток [1]. Действительно, дазатиниб убивает «сенесцентные» предшественники жировых клеток, в то время как кверцетин более эффективен в отношении эндотелиальных клеток человека и мышечных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения. Тем не менее, другой природный флавоноид, физетин, также стал популярным препаратом, тестируемым в качестве сенолитика. Физетин обладает более высокой сенолитической активностью и более сильным прооксидантным действием, чем кверцетин, поэтому его часто используют не в комбинации с дазатинибом, а отдельно [30]. Многие из проводимых сейчас первых клинических фаз испытаний проводятся на этих трех соединениях.

Для поиска сенолитиков второго поколения используют высокопроизводительные методы скрининга лекарственных препаратов. Такие сенолитические средства в теории будут более избирательными в отношении «сенесцентных» клеток [31].

Более перспективными кажутся препараты, принцип действия которых основан на высокой лизосомной активности «сенесцентных» клеток. Они могут быть нацелены на характерное для «сенесцентных» клеток увеличение массы лизосом и повышение активности связанной со старением β -галактозидазы. На этом принципе основано действие пролекарства SSK1 (senescence-specific killing compound 1), активируемого β -галактозидазой [32] и проявившего активность не только в отношении разных «сенесцентных» клеточных культур, но и в исследованиях на мышах. Однако работы в этом направлении только начинаются, пока рано судить о результатах и реализуемости идеи на практике.

Еще одним способом борьбы с «сенесцентными» клетками может быть модуляция иммунного клиренса этих клеток. Этот способ основан на иммунизации против определенных белков, характерных для «сенесцентных» клеток [33], или на создании конъюгатов «антитело-лекарственное средство» против определенных эпитопов [34]. Явным преимуществом такого подхода является

очень высокая специфичность, недостатком — более высокая цена по сравнению с другими способами и потенциальная небезопасность, так как остановить такое лечение в случае обнаружения серьезных побочных эффектов будет гораздо сложнее [5].

Другими мишенями сенолитиков могут быть участники сигнальных путей, способствующих выживанию клеток. Такие, как HSP90, экспрессия которого увеличивается в ответ на стрессовые условия [35], ремоделирующие хроматин белки BET [36], стабилизаторы p53, действующие через FOXO4 (member of the forkhead family of transcription factors in O subclass) [37], или ингибитор убиквитин-специфической протеазы 7 (USP7, ubiquitin-specific protease 7) [38] и др.

Наряду с сенолитиками в настоящее время активно исследуются сеноморфные препараты — ингибиторы SASP. Сторонники сенолитических препаратов считают, что сеноморфные средства потребуют постоянного приема, в то время как для достижения результата с помощью сенолитиков достаточно будет одного или нескольких курсов лечения [5]. Тем не менее, сеноморфики потенциально не должны сокращать количество клеток в тканях [29]. Теоретически, такой подход кажется более безопасным, так как нет риска потерять критически важные клетки или их группы. К сеноморфикам относят многие препараты, которые раньше относили к геропротекторам, например некоторые миметики ограничения питания (рапамицин, метформин). Так как миметики ограничения питания могут обладать сеноморфической активностью, того же эффекта, вероятно, можно добиться немедикаментозным способом — диетами, тренировками и т.д.

К сеноморфическим препаратам относятся также ингибиторы ядерного фактора транскрипции NF- κ B и пути передачи сигнала JAK-STAT. Как показывает биоинформатический анализ [39], довольно часто между сенолитиками и сеноморфиками не удается провести четкую границу, а некоторые препараты могут относиться и к той, и к другой группе.

Доклинические и клинические испытания

Доклинические испытания, как правило, выявляют хорошую эффективность сенолитиков в отношении подавления SASP, однако в длительных экспериментах с построением кривых выживания животных получены в основном не очень яркие результаты. Удастся преимущественно добиться небольшого продления средней продолжительности жизни мышей [23, 40, 41]. В то же время в недавнем исследовании с помощью полифенольного компонента из экстракта виноградных косточек, процианидина C1 (procyanidin C1), удалось довольно заметно увеличить и медианную, и максимальную продолжительность жизни мы-

шей [42]. У животных также улучшались показатели физической активности и выносливости, было снижено проявление SASP, особенно в легких, при этом масса и потребление пищи не изменялись. Результаты выглядят многообещающими, препарат, вероятно, необходимо проверить и на других модельных объектах.

Сенолитики действительно могут не только подавлять проявление биомаркеров старения, но и улучшать физическое состояние животных. Лечение мышей C57BL/6 комбинацией дазатиниба и кверцетина способствует снижению частоты дегенерации межпозвоночных дисков и приводит к значительному снижению проявления целого ряда маркеров старения [43]. Эта же комбинация препаратов значительно улучшает некоторые показатели работы сердца — например, фракцию выброса левого желудочка — у мышей *Ercs1*^{Δ/-} [1], а также снижает общий стеатоз печени у мышей C57BL/6(*INK-ATTAC*) [44] и улучшает когнитивные функции у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантные формы человеческого белка-предшественника амилоида и пресенилина-1 [45]. Ингибитор JAK руксолитиниб предотвращает возрастную потерю костной массы у мышей C57BL/6 [46]. Использование ингибитора HSP90, 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-диметиламиноэтиламино-17-деметоксигелданамицин), снижает целый ряд показателей физической дисфункции и проявление биомаркеров старения в почках у мышей *Ercs1*^{Δ/-} [47].

Многообещающие результаты доклинических исследований самых популярных сенолитиков (дазатиниб, кверцетин, физетин) способствовали началу клинических испытаний. Предполагается, что с помощью сенолитических препаратов можно будет лечить целый ряд возрастных патологий — атеросклероз, остеоартрит, остеопороз, хроническую обструктивную болезнь легких, легочный фиброз, а также рак, диабет и нейродегенеративные заболевания [48]. Пока все исследования находятся на первой или второй стадиях. Тем не менее, в клинических испытаниях уже наблюдается целый ряд побочных эффектов. Например, препарат АВТ-263 (навитоклакс) обладает заметной сенолитической активностью, вызывая терапевтический эффект у мышей, склонных к атеросклерозу [49], однако клинические испытания аналогичного коммерческого препарата UBX0101 [50], также ингибирующего Bcl-2, досрочно прекращены на второй фазе [5, 7] из-за побочных эффектов в виде тромбоцитопении и нейтропении [29].

Нужно отметить, что обнаруживаемые при использовании сенолитиков побочные эффекты связаны преимущественно с кровеносной системой: тромбоцитопения, нейтропения, нарушения гемопоэза, эндотелиальная дисфункция, легочная гипертензия и др. Побочные эффекты, наблюдае-

мые в клинических испытаниях, заставляют задуматься о способе введения препаратов. Вероятно, системное применение — перорально или внутривенно — сопряжено с повреждением в тех системах, с которыми непосредственно контактирует препарат. В таком случае более безопасным способом может быть локальное воздействие на ткани. Такое применение не позволит добиться значительных результатов в отношении некоторых органов из-за сложностей с доставкой препаратов, но для некоторых видов тканей может оказаться применимым.

Дальнейшие перспективы и возможные ограничения

На наш взгляд, применение сенолитических препаратов может столкнуться с рядом препятствий. Некоторые из них, как мы отметили выше, связаны с побочными эффектами или низкими эффективностью и биодоступностью исследуемых препаратов [28, 29, 51, 52]. Но есть и другой ключевой момент — возрастная потеря клеток в тканях. Некоторые ткани содержат клетки, которые могут делиться на протяжении всей жизни, другие — клетки, которые делятся редко или совсем не могут делиться (скелетная мускулатура, сердце, мозг). Потеря клеток в скелетных мышцах приводит к развитию возрастной атрофии и саркопении, а в мозге — к развитию когнитивных дисфункций. Хотя подсчитать реальную потерю высокодифференцированных мышечных и нервных клеток сложно [53], уменьшение их количества отчетливо проявляется в потере функциональности органов [54–56]. Также теряют клетки и другие жизненно важные органы, в которых замена клеток возможна, но пролиферативная активность с возрастом становится не такой эффективной [57–59]. Потери клеток в этих тканях и органах из-за применения сенолитических препаратов могут усугубить их состояние. Хотя высокодифференцированные клетки и «сенесцентные» клетки — это разные типы [53, 60], появление липофусцина в тканях старых животных и людей (особенно в мозге, мышцах и коже) говорит о том, что их высокодифференцированные клетки у пожилых уже имеют нарушения, похожие на SASP, поэтому под воздействием сенолитиков возможна их ускоренная гибель. Кроме того, проявление биомаркеров старения может быть обратимым состоянием некоторых специализированных клеток, необходимым для осуществления их функций. Примером являются макрофаги, в которых в ответ на физиологические стимулы обратимо индуцируется активация ассоциированной со старением β-галактозидазы [61]. Таким образом, важно помнить, что проявление какого-либо биомаркера не обязательно говорит о том, что клетка «сенесцентная», как и наоборот, отсутствие проявления какого-либо биомаркера не доказывает, что клетка не «сенесцентная» [3].

Как уже было сказано выше, пероральное или внутривенное введение, возможно, не является оптимальным, хотя этот фактор закладывался в алгоритмы поиска подходящих сенолитиков еще при поиске препаратов первого поколения [5]. Возможно, локальное применение может оказаться более перспективным. Например, на модели «имплантации *in vitro*» было показано, что можно уменьшить неблагоприятное воздействие подвергнутых SIPS стромальных клеток эндометрия на децидуализацию и имплантацию, если подействовать на них рапамицином и метформином (как сеноморфическими препаратами) [62]. Пока это только исследование на экспериментальной модели, но кажется перспективной обработка некоторых полостных органов сенотерапевтическими препаратами для улучшения их функциональной активности.

Наконец, одни и те же сенолитики могут по-разному влиять на разные клетки, так как и сами «сенесцентные» клетки различаются по экспрессии маркеров и способам ухода от апоптоза [1, 3, 9]. Это затрудняет поиск подходящих препаратов, так как потребуется много времени, чтобы изучить влияние самых разных сенолитиков и сеноморфиков на различные типы клеток (*in vitro* и *in vivo*). Кроме того, требуется больше исследований о влиянии второго поколения сенолитиков на разные модельные объекты, так как имеющихся данных пока недостаточно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu Y.I., Tchkonina T., Pirtskhalava T., Gower A.C., Ding H., Giorgadze N., Palmer A.K., Ikeno Y., Hubbard G.B., Lenburg M., O'Hara S.P. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Ageing Cell*. 2015;14(4):644–658.
2. Childs B.G., Gluscevic M., Baker D.J., Laberge R.M., Marquess D., Dananberg J., Van Deursen J.M. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2017;16(10):718–735.
3. Niedernhofer L.J., Robbins P.D. Senotherapeutics for healthy ageing. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2018;17(5):377.
4. Boccardi V., Mecocci P. Senotherapeutics: Targeting senescent cells for the main age-related diseases. *Mech. Ageing Dev*. 2021;197:111526.
5. Chaib S., Tchkonina T., Kirkland J.L. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat. Med*. 2022;28(8):1556–1568.
6. Моргунова Г.В., Хохлов А.Н. Перспективы сенотерапевтических препаратов: далеко ли от исследований до клиники? *Клин. геронтол.* 2023;29(9–10):29–33.
7. Raffaele M., Vinciguerra M. The costs and benefits of senotherapeutics for human health. *Lancet Healthy Longev*. 2022;3(1):e67–77.
8. Livshits G., Kalinkovich A. Inflammaging as a common ground for the development and maintenance of sarcopenia, obesity, cardiomyopathy and dysbiosis. *Ageing Res. Rev*. 2019;56:100980.
9. Uyar B., Palmer D., Kowald A., Escobar H.M., Barrantes I., Möller S., Akalin A., Fuellen G. Single-cell

Заключение

Несмотря на бурный рост интереса к теме сенотерапевтических препаратов, она еще плохо раскрыта. Активно ведется поиск препаратов на всех этапах — высокопроизводительный скрининг библиотек, эксперименты на самых разных клеточных линиях и модельных объектах, клинические испытания. Серьезным препятствием становятся выявляемые побочные эффекты. Крайне важно изучать влияние сенолитиков и сеноморфиков в экспериментах с построением кривых выживания животных, чтобы оценивать их воздействие на продолжительность жизни. Популярность темы способствует развитию тестирований препаратов на клетках и обсуждению проблемы старения на клеточном уровне [20, 53, 60, 63], что, вероятно, должно пролить свет на вопросы о том, что первично — старение клеток или старение окружающей их среды (матрикса, тканевой жидкости и т.д.).

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № 121032300215–6). Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

analyses of aging, inflammation and senescence. *Ageing Res. Rev*. 2020;64:101156.

10. Santoro A., Bientinesi E., Monti D. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res. Rev*. 2021;71:101422.

11. Thoppil H., Riabowol K. Senolytics: A translational bridge between cellular senescence and organismal aging. *Front. Cell Dev. Biol*. 2020;7:367.

12. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. 1961;25(3):585–621.

13. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. 1965;37(3):614–636.

14. Khokhlov A.N. Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cytoogerontological research. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2013;68:158–161.

15. Neri F., Basisty N., Desprez P.Y., Campisi J., Schilling B. Quantitative proteomic analysis of the senescence associated secretory phenotype by data independent acquisition. *Curr. Protoc*. 2021;1(2):e32.

16. Paramos de Carvalho D., Jacinto A., Saúde L. The right time for senescence. *eLife*. 2021;10:e72449.

17. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull*. 2014;69(1):10–14.

18. Khokhlov A.N. Which aging in yeast is “true”? *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2016;71(1):11–13.

19. 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.
20. Ogrodnik M. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest *in vitro* and *in vivo*. *Aging Cell.* 2021;20(4):e13338.
21. 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.
22. Song S., Tchkonja T., Jiang J., Kirkland J.L., Sun Y. Targeting senescent cells for a healthier aging: challenges and opportunities. *Adv. Sci.* 2020;7(23):2002611.
23. Xu M., Pirtskhalava T., Farr J.N., et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat. Med.* 2018;24(8):1246–1256.
24. Vicencio J.M., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasdemir E., Morselli E., Ben Younes A., Maiuri M.C., Lavandro S., Kroemer G. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path—a mini-review. *Gerontology.* 2008;54(2):92–99.
25. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 2005;120(4):513–522.
26. Gorgoulis V., Adams P.D., Alimonti A., Bennett D.C., Bischof O., Bishop C., Campisi J., Collado M., Evangelou K., Ferbeyre G., Gil J. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell.* 2019;179(4):813–827.
27. Kirkland J.L., Tchkonja T. Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine.* 2017;21:21–28.
28. Ильяшенко А.К., Мачехина Л.В., Ткачева О.Н., Балашова А.В., Мельницкая А.А., Чуров А.В., Стражеско И.Д. Сенолитические препараты: возможность применения в клинической практике. *Проблемы геронауки.* 2023;(1):7–14.
29. Power H., Valtchev P., Dehghani F., Schindeler A. Strategies for senolytic drug discovery. *Aging Cell.* 2023;22(10):e13948.
30. Wang Y., He Y., Rayman M.P., Zhang J. Prospective selective mechanism of emerging senolytic agents derived from flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2021;69(42):12418–12423.
31. Zhang L., Pitcher L.E., Prahalad V., Niedernhofer L.J., Robbins P.D. Recent advances in the discovery of senolytics. *Mech. Ageing Dev.* 2021;200:111587.
32. Cai Y., Zhou H., Zhu Y., Sun Q., Ji Y., Xue A., Wang Y., Chen W., Yu X., Wang L., Chen H. Elimination of senescent cells by β -galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res.* 2020;30(7):574–589.
33. Suda M., Shimizu I., Katsuomi G., Yoshida Y., Hayashi Y., Ikegami R., Matsumoto N., Yoshida Y., Mikawa R., Katayama A., Wada J. Senolytic vaccination improves normal and pathological age-related phenotypes and increases lifespan in progeroid mice. *Nat. Aging.* 2021;1(12):1117–1126.
34. Poblocka M., Bassey A.L., Smith V.M., Falcichio M., Manso A.S., Althubiti M., Sheng X., Kyle A., Barber R., Frigerio M., Macip S. Targeted clearance of senescent cells using an antibody-drug conjugate against a specific membrane marker. *Sci. Rep.* 2021;11(1):20358.
35. Dubrez L., Causse S., Borges Bonan N., Dumétier B., Garrido C. Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair. *Oncogene.* 2020;39(3):516–529.
36. Kulikowski E., Rakai B.D., Wong N.C. Inhibitors of bromodomain and extra-terminal proteins for treating multiple human diseases. *Med. Res. Rev.* 2021;41(1):223–245.
37. Dolgin E. Send in the senolytics. *Nat. Biotechnol.* 2020;38(12):1371–1378.
38. He Y., Li W., Lv D., Zhang X., Zhang X., Ortiz Y.T., Budamagunta V., Campisi J., Zheng G., Zhou D. Inhibition of USP7 activity selectively eliminates senescent cells in part via restoration of p53 activity. *Aging Cell.* 2020;19(3):e13117.
39. Olascoaga Del Angel K.S., Gutierrez H., Königsberg M., Pérez Villanueva J., López Diazguerrero N.E. Exploring the fuzzy border between senolytics and senomorphics with chemoinformatics and systems pharmacology. *Biogerontology.* 2022;23(4):453–471.
40. Kowald A., Kirkwood T.B. Senolytics and the compression of late-life mortality. *Exp. Gerontol.* 2021;155:111588.
41. Gille B., Muller-Eigner A., Gottschalk S., Wytrwat E., Langhammer M., Peleg S. Longevity interventions in Titan mice attenuate frailty and senescence accumulation. *bioRxiv.* 2023:2023–2009.
42. Xu Q., Fu Q., Li Z., Liu H., Wang Y., Lin X., He R., Zhang X., Ju Z., Campisi J., Kirkland J.L. The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice. *Nat. Metab.* 2021;3(12):1706–1726.
43. Novais E.J., Tran V.A., Johnston S.N., Darris K.R., Roupas A.J., Sessions G.A., Shapiro I.M., Diekmann B.O., Risbud M.V. Long-term treatment with senolytic drugs Dasatinib and Quercetin ameliorates age-dependent intervertebral disc degeneration in mice. *Nat. Commun.* 2021;12(1):5213.
44. Ogrodnik M., Miwa S., Tchkonja T., Tiniakos D., Wilson C.L., Lahat A., Day C.P., Burt A., Palmer A., Anstee Q.M., Grellescheid S.N. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat. Commun.* 2017;8(1):15691.
45. Zhang P., Kishimoto Y., Grammatikakis I., Gottimukkala K., Cutler R.G., Zhang S., Abdelmohsen K., Bohr V.A., Misra Sen J., Gorospe M., Mattson M.P. Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* 2019;22(5):719–728.
46. Farr J.N., Xu M., Weivoda M.M., Monroe D.G., Fraser D.G., Onken J.L., Negley B.A., Sfeir J.G., Ogrodnik M.B., Hachfeld C.M., LeBrasseur N.K. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat. Med.* 2017;23(9):1072–1079.
47. Fuhrmann-Stroissnigg H., Ling Y.Y., Zhao J., McGowan S.J., Zhu Y.I., Brooks R.W., Grassi D., Gregg S.Q., Stripay J.L., Dorronsoro A., Corbo L. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat. Commun.* 2017;8(1):422.
48. Lagoumtzi S.M., Chondrogianni N. Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2021;171:169–190.
49. Childs B.G., Baker D.J., Wijshake T., Conover C.A., Campisi J., Van Deursen J.M. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science.* 2016;354(6311):472–477.
50. Yang H., Chen C., Chen H., Duan X., Li J., Zhou Y., Zeng W., Yang L. Navitoclax (ABT263) reduces inflammation and promotes chondrogenic phenotype by clearing senescent osteoarthritic chondrocytes in osteoarthritis. *Aging (Albany N.Y.).* 2020;12(13):12750.
51. Raffaele M., Kovacicova K., Frohlich J., Lo Re O., Giallongo S., Oben J.A., Faldyna M., Leva L., Giannone A.G., Cabibi D., Vinciguerra M. Mild exacerbation of obesity-and age-dependent liver disease progression by

senolytic cocktail dasatinib+ quercetin. *Cell Commun. Signal.* 2021;19:44.

52. Sharma A.K., Roberts R.L., Benson Jr. R.D., Pierce J.L., Yu K., Hamrick M.W., McGee-Lawrence M.E. The senolytic drug navitoclax (ABT-263) causes trabecular bone loss and impaired osteoprogenitor function in aged mice. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:354.

53. 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.

54. Vandervoort A.A. Aging of the human neuromuscular system. *Muscle Nerve*. 2002;25(1):17–25.

55. Morteá P., Herculano-Houzel S. Age-related neuronal loss in the rat brain starts at the end of adolescence. *Front. Neuroanat.* 2012;6:45.

56. Frontera W.R., Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* 2015;96(3):183–195.

57. Iakova P., Awad S.S., Timchenko N.A. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBP α growth arrest. *Cell*. 2003;113(4):495–506.

58. Stolzing A., Scutt A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell*. 2006;5(3):213–224.

59. Baiocchi L., Glaser S., Francis H., Kennedy L., Felli E., Alpini G., Gracia-Sancho J. Impact of aging on liver cells and liver disease: focus on the biliary and vascular compartments. *Hepatol. Commun.* 2021;5(7):1125–1137.

60. von Zglinicki T., Wan T., Miwa S. Senescence in post-mitotic cells: a driver of aging? *Antioxid. Redox Signal.* 2021;34(4):308–323.

61. Hall B.M., Balan V., Gleiberman A.S., Strom E., Krasnov P., Virtuoso L.P., Rydkina E., Vujcic S., Balan K., Gitlin I.I., Leonova K.I. p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli. *Aging (Albany N.Y.)*. 2017;9(8):1867.

62. Deryabin P.I., Borodkina A.V. Stromal cell senescence contributes to impaired endometrial decidualization and defective interaction with trophoblast cells. *Hum. Reprod.* 2022;37(7):1505–1524.

63. Gems D., Kern C.C. Is “cellular senescence” a misnomer? *Geroscience*. 2022;44(5):2461–2469.

Поступила в редакцию 18.09.2023

После доработки 22.12.2023

Принята в печать 25.12.2023

REVIEW

Drugs with senolytic activity: prospects and possible limitations

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

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

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

The search and testing of drugs with senolytic activity is one of the new directions in gerontology. The number of “senescent” cells that increases with age contributes to the development of age-related diseases and chronic non-infectious inflammation. Removing “senescent” cells or suppressing their influence on surrounding tissues seems a logical step to improve the quality of life and, possibly, prolong lifespan. However, drugs that have senolytic and senomorphic activity in model systems cause the development of a number of side effects in clinical trials. In this review, we consider the main advances in the field of senotherapy, the prospects for the use of senotherapy drugs, and the limitations that researchers and clinicians may encounter.

Keywords: *aging, cell cultures, biomarkers of aging, senolytics, senomorphics, cytoogerontology*

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

Сведения об авторе

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

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>

**УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ
«ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕРИЯ 16. БИОЛОГИЯ» В 2023 ГОДУ**

	№	Стр.
Обзоры		
<i>Воробьева Н.В.</i> Нейтрофилы – атипичные антигенпрезентирующие клетки	2	55
<i>Кириенко Е.С., Давидович Н.А.</i> Особенности репродуктивной биологии представителей рода <i>Haslea</i> Simonsen (Bacillariophyta), позволяющие применять методы классической селекции.....	3	139
<i>Моргунова Г.В., Хохлов А.Н.</i> Препараты с сенолитической активностью: перспективы и возможные ограничения	4	278
<i>Олескин А.В., Боян Ц.</i> Взаимодействие нейротрансмиттеров с микроводорослями: концептуальные и практические аспекты	3	146
<i>Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В.</i> Физиологические эффекты полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в организме рыб	3	127
Оригинальные исследования		
<i>Васильев А.Н., Крючкова А.Г., Маковская А.Е.</i> Повышенная чувствительность пространственных фильтров при совмещении магнитного и электрического компонентов сенсомоторного кортикального бета-ритма	1	3
<i>Волгушева А.А., Конюхов И.В., Антал Т.К.</i> Оценка первичных реакций фотосинтеза в индивидуальных клетках микроводорослей микрофлуориметрическим методом	3	170
<i>Воробьева Н.В.</i> Участие митоген-активируемых протеинкиназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы В Akt1/2 в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек.....	4	243
<i>Воробьева Н.В.</i> Участие нерецепторных тирозинкиназ Src-семейства в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек.....	1	11
<i>Воронина Я.А., Кузьмин В.С.</i> Влияние пробенецида на проаритмические эффекты активации альфа-1-адренорецепторов в атриовентрикулярном узле сердца крысы.....	4	258
<i>Егорова Д.О., Санников П.Ю., Хотяновская Ю.В., Бузмаков С.А.</i> Состав бактериальных сообществ нефтезагрязненных донных отложений реки Каменка.....	1	17
<i>Ездакова М.И., Матвеева Д.К., Андрианова И.В., Андреева Е.Р.</i> Чувствительность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток к короткому гипоксическому стрессу <i>in vitro</i> зависит от эффективности гомотипической коммуникации через щелевые контакты	3	195
<i>Еникеев Р.Р., Захарчук Л.М.</i> Бактерии рода <i>Bacillus</i> на Международной космической станции	3	178
<i>Кириллова И.А., Кириллов Д.В.</i> Жизнь на краю ареала: сравнительное изучение центральных и краевых популяций <i>Dactylorhiza traunsteineri</i> (Orchidaceae) на европейском северо-востоке России.....	2	95

<i>Киселевский Д.Б., Олескин А.В., Самуилов В.Д.</i> Действие нейромедиаторов на программируемую клеточную смерть и образование активных форм кислорода в эпидермисе листьев гороха	4	227
<i>Коваленко М.И., Георгиева М.Л., Козловский В.В., Максимова И.А., Качалкин А.В., Бубнова Е.Н.</i> Микобиота красной водоросли <i>Palmaria palmata</i> в Кандалакшском заливе Белого моря	1	25
<i>Лавренов А.Р., Мышлявкина Т.А., Умнова Н.В., Ким А.И., Румак В.С.</i> Особенности экспрессии маркерных генов рыжей полевки <i>Clethrionomys glareolus</i> , отражающие эффекты экотоксичности загрязненной диоксинами среды	2	86
<i>Мамчур А.А., Ерема В.В., Кашианова Д.А., Иванов М.В., Юдин В.С., Кескинов А.А., Краевой С.А., Юдин С.М.</i> Изучение конформационной подвижности липид-связывающего сайта изоформ $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ аполипопротеина Е методом молекулярной динамики	2	70
<i>Павлюченкова А.Н., Кутырев И.А., Федоров А.В., Челомбитко М.А., Мазур О.Е., Дугаров Ж.Н.</i> Исследование противовоспалительных свойств секреторно-экскреторных продуктов плероцеркоидов лентеца чаечного <i>Dibothriocephalus dendriticus</i> и лигулы <i>Ligula interrupta</i>	3	160
<i>Павлюченкова А.Н., Смирнов М.С., Челомбитко М.А.</i> Влияние карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP) на Fc ϵ RI-зависимую продукцию цитокинов клетками RBL-2H3	2	78
<i>Репкова М.Н., Мазурков О.Ю., Филиппова Е.И., Проценко М.А., Мазуркова Н.А., Челобанов Б.П., Левина А.С., Зарытова В.Ф.</i> Олигорибонуклеотид-содержащие наноконплексы на основе наночастиц аминопропилсиланола как эффективные ингибиторы репликации вируса гриппа А	4	267
<i>Сингх-Пальчевская Л., Шайтан А.К.</i> Разнообразие гистонов H2A и их влияние на структурные свойства нуклеосомы	4	235
<i>Столяров А.П.</i> Особенности видовой, пространственной и трофической структуры макробентоса в лагунной экосистеме Никольской губы (Кандалакшский залив, Белое море)	1	35
<i>Телегина Д.В., Пеунов Д.А., Козлова Т.А., Колосова Н.Г., Кожевникова О.С.</i> Оценка состояния гематоретинального барьера при развитии признаков возрастной макулярной дегенерации у крыс OXYS	3	205
<i>Тиморшина С.Н., Попова Е.А., Кулешова К.И., Акьол А.К., Осмоловский А.А.</i> Кератинолитический потенциал микромицета <i>Aspergillus clavatus</i> ВКПМ F-1593 и сравнение его ферментов с коммерческим препаратом кератиназы	4	250
<i>Тодоренко Д.А., Сидоченко Н.Д., Байжуманов А.А., Братковская Л.Б., Маторин Д.Н.</i> Первичные процессы фотосинтеза <i>Thalassiosira weissflogii</i> при воздействии ципрофлоксацина	3	186
<i>Яковлев А.Г., Таисова А.С., Фетисова З.Г.</i> Адаптация зеленых фотосинтезирующих бактерий к разной освещенности по данным спектроскопии хлоросом	2	64

Краткие сообщения

<i>Кижина А.Г., Мащинская М.С., Панова Э.В., Илюха В.В.</i> Влияние различных сахарозаменителей на содержание гликогена лейкоцитов крови и состав лейкоцитарной формулы у мышей C57BL/6	4	273
---	---	-----

<i>Осмоловский А.А., Домбек И., Хауке С., Орехова А.В., Крейер В.Г.</i> Сравнение антикоагулянтного действия <i>in vitro</i> протеаз, секретируемых микромицетом <i>Aspergillus ochraceus</i> и содержащихся в яде змей.....	1	43
<i>Осмоловский А.А., Шестакова А.А., Суркова Д.Е., Лехотска Р., Пецкова Е.</i> Изучение спектра активности новых штаммов микромицетов рода <i>Aspergillus</i> в отношении белков системы гемостаза	2	109
<i>Стаханова А.А., Воскресенская О.Г., Голубович В.П., Каменский А.А.</i> Влияние пептида Ас-D-MPRG на основе С-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина(6-9) на поведение крыс разного возраста	2	102
Мнения		
<i>Хохлов А.Н.</i> Основы биологии старения для небиологов МГУ.....	2	115
<i>Хохлов А.Н.</i> Почему у пресноводной гидры не бывает болезни Альцгеймера	3	213

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, межстрочный интервал – полуторный, отступ – 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается [шаблон статьи](#)). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). 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 пристатейного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

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

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

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

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

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). *Название книги*. Город: Название издательства (без кавычек); год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название сборника*. Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Название издательства (без кавычек); год:страницы.

4) **Электронный ресурс.** *Название сайта* [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). [Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана].

5) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс]. *Название источника*. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry — J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

*Примеры оформления источников в списке литературы:***Статья в журнале:**

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

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

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

Книга:

Holliday R. *Aging: the paradox of life: why we age*. Dordrecht: Springer; 2007. 132 pp.

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

Статья в сборнике:

Mahajan M., Yadav R.K. Labeling and sorting of Arabidopsis SAM cell populations to capture their transcriptome profile. *Plant Stem Cells: Methods and Protocols*, vol. 2094. Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana; 2020:39–47.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв. *Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.)*. Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии; 2013:174–176.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.03.2021).

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

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс]. *IUCN Red List of Threatened Species*. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

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

Дополнительные правила оформления

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

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия – NaCl, углекислый газ – 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 подвиговые 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](#)